

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CARINE ANDRADE CELEIRA DE LIMA

CONSTRUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ANTICORPO DE CADEIA ÚNICA
(SCFVLIMAB7) ESPECÍFICO PARA TOXINAS DERMONECRÓTICAS DE
Loxosceles intermedia

Curitiba

2013

CARINE ANDRADE CELEIRA DE LIMA

CONSTRUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ANTICORPO DE CADEIA ÚNICA
(SCFVLIMAB7) ESPECÍFICO PARA TOXINAS DERMONECRÓTICAS DE
Loxosceles intermedia

Dissertação apresentada como requisito parcial à
obtenção do grau de Mestre em Microbiologia,
Parasitologia e Patologia ao curso de Pós-
Graduação em Microbiologia, Parasitologia e
Patologia, Setor de Ciências Biológicas,
Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof^a. Dra. Larissa Magalhães
Alvarenga

Curitiba
2013

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Rosilei Vilas Boas – CRB/9-939).

Lima, Carine Andrade Celeira de
Construção e caracterização de anticorpo de cadeia única
(SCFVLIMAB7) específico para toxinas dermonecróticas de *Loxosceles
intermedia*. / Carine Andrade Celeira de Lima. – Curitiba, 2013.
70 f.: il. ; 30cm.

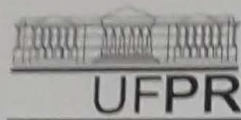
Orientadora: Larissa Magalhães Alvarenga.

Coorientadores: Wanderson Duarte da Rocha e Juliana Ferreira de
Moura.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia,
Parasitologia e Patologia.

1. Aranha – Veneno. 2. Aranha Marrom Reclusa. 3. Anticorpos de Cadeia
Única. 4. Anticorpos monoclonais. I. Título. II. Alvarenga, Larissa Magalhães.
III. Rocha, Wanderson Duarte da. IV. Moura, Juliana Ferreira de. V.
Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de
Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

CDD (20. ed.) 615.942



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Patologia Básica
Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

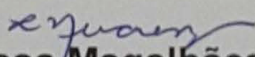
TERMO DE APROVAÇÃO

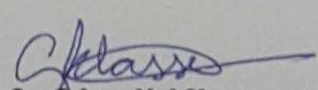
"CONSTRUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ANTICORPO DE CADEIA ÚNICA (SCFVLIMAB7) ESPECÍFICO PARA TOXINASDERMONECRÓTICAS DE *LOXOSCELES INTERMEDIA*"

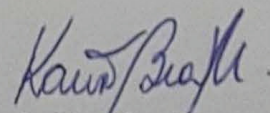
Por

CARINE ANDRADE CELEIRA DE LIMA

**Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do
grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Microbiologia,
Parasitologia e Patologia, pela Comissão formada pelos
professores:**


Prof^a. Dr^a. Larissa Magalhães Alvarenga (presidente)


Prof^a. Dr^a. Giseli Klassen


Prof^a. Dr^a. Karin Braun Prado

Curitiba, 13 de março de 2013.

*Dedico este trabalho a Elaine, Elienne, Celine e Edgar,
que todos os dias me incentivam a ser o melhor de mim.*

AGRADECIMENTOS

À Professora Larissa Magalhães Alvarenga pela sabedoria, pela amizade, pelos ensinamentos, pelo exemplo e principalmente... Pela paciência!;

À Professora Juliana Ferreira de Moura pela ajuda, disponibilidade e pela orientação;

Ao Professor Wanderson Duarte da Rocha pelos conselhos e pelos puxões de orelha;

Aos colegas de laboratório Camilóvski Zanatta, Seibrina Karim, Alejandra Becker, Rafaela Fogaça, Rodrigo Almeida e Isabel Yamanaka pela companhia, companheirismo, amizade e pelos ótimos e inesquecíveis momentos no Laboratório de Imunoquímica;

Aos colegas de laboratório Karla Katayama e Luís Figueiredo;

Ao programa de pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia;

Aos amigos Devânia, Pedro e Renata pelos ouvidos, pelo apoio e pelas conversas;

Aos meus pais e irmã, pelo amor, compreensão e incentivo;

Aos tios Elienne, Edmilson e Sheila; e aos primos Érika, Tathyana, Jo e Felipe pela presença constante, preocupação e por serem sempre família;

E ao Haru, por alegrar os meus dias;

Muito obrigada!

Naturalmente, está acontecendo dentro da sua cabeça, mas por que isto significaria que não é real?

J. K. Rowling

RESUMO

O loxoscelismo, ou o acidente causado por aranhas do gênero *Loxosceles*, é um grave problema de saúde pública em alguns estados do Brasil, atingindo mais de 8.000 casos notificados no ano de 2011. Os acidentes podem resultar em manifestações cutâneas, com a formação de lesões dermonecroticas, e em manifestações sistêmicas, caracterizadas por distúrbios hematológicos. Vários tratamentos já foram propostos para o loxoscelismo, mas poucos possuem sua eficácia comprovada. Acredita-se que dentre as intervenções terapêuticas disponíveis, o emprego dos soros antiloxoscélico ou antiaracnídico seja o mais eficaz para a diminuição de efeitos viscerais e cutâneos quando administrados nas primeiras horas após o envenenamento. Entretanto, apesar da utilização de antivenenos ter sua eficácia comprovada, reações de hipersensibilidade já foram notificadas em até 20% dos pacientes após administração de soros equinos, os mais utilizados no país. Desse modo, muitos estudos foram e vem sendo realizados visando a produção de uma nova geração de antivenenos. Neste trabalho, é proposta a construção de anticorpos de cadeia única (scFvs) a partir do anticorpo monoclonal LimAb7, sabidamente capaz de neutralizar os efeitos dermonecroticos do veneno de *L. intermedia*, a espécie prevalente no país e no estado do Paraná. Diferentes estratégias foram utilizadas para a construção do anticorpo recombinante, desde a extração do RNA do hibridoma murino até a avaliação de sua reatividade em imunoenaios frente ao veneno de *Loxosceles* sp. Com os resultados obtidos, é possível afirmar que as estratégias aqui empregadas contribuíram para a obtenção de um anticorpo de cadeia única capaz de reconhecer proteínas do veneno de *L. intermedia*. É uma perspectiva para este trabalho melhor avaliar a capacidade de neutralização de frações tóxicas do veneno de *L. intermedia* empregando a proteína recombinante scFvLimAb7.

Palavras chave: *Loxosceles intermedia*; scfv; anticorpos recombinantes; limAb7.

ABSTRACT

Loxoscelism, or the accident caused by *Loxosceles* spider, is a serious problem of public health in some states in Brazil, achieving more than 8.000 notified cases in 2011. The accidents may result in cutaneous manifestations, such as dermonecrotic lesions, and systemic manifestations, characterized by hematological disturbs. Several treatments were already suggested for loxoscelism, however, only a few have their efficacy proved. It's believed that among therapeutic interventions available, the use of antiaracnidic or antiloxoscelic serum has the greatest efficacy for diminishing cutaneous and visceral effects when given in the first few hours after envenomation. However, despite antivenom has a proved efficacy, hypersensitivity reactions were notified by 6 to 20% of patients after administration of equine serum, the commonly used in Brazil. Thus, many studies have suggested the production of a new generation of antivenom. In this work, it's aimed the constrution of single chain antibodies (scFvs) from the monoclonal antibody LimAb7, known for neutralizing dermonecrotic effects of *L. intermedia* venom, the prevalent specie in the country and in Parana state. A diversity of strategies was used for the recombinant antibody construction, from the RNA extraction of the murine hybridoma to the evaluation of its reactivity to *Loxosceles* sp venom in immunoassays. The obtained results confirm that the strategies employed here contributed to the acquisition of a single chain antibody capable of recognizing *L. intermedia* venom proteins. It's a perspective to this work better evaluate the recombinant protein scFvLimAb7 neutralizing capacity to *L. intermedia* venom toxic fractions.

Key words: *Loxosceles intermedia*; scFv; recombinant antibodies; limAb7.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1: DIFERENTES CONSTRUÇÕES DE FRAGMENTOS DE ANTICORPOS: (A) IMUNOGLOBULINA ORIGINAL; (B) FRAGMENTO FAB; (C) FRAGMENTO F(AB') ₂ ; (D) <i>SINGLE-CHAIN FRAGMENT VARIABLE</i> ; (E) DÍMERO DE SCFV; (F) SCFVS EM TANDEM; (G) NANOBODIES BIVALENTES; E (H) ANTICORPO QUIMÉRICO <i>NANOBODY-HUMAN</i> FC. CADEIAS LEVES SÃO REPRESENTADAS NA COLORAÇÃO AZUL E CADEIAS PESADAS EM AMARELO, LARANJA E VERMELHO. ADAPTADO DE ESPINO-SOLIS <i>ET AL</i> , 2009.....	18
FIGURA 2: <i>LOXOSCELES</i> SP COM PADRÃO DE PIGMENTAÇÃO EM FORMA DE VIOLINO NO CEFALOTÓRAX (MOREIRA, 2008).	22
FIGURA 3: LESÃO DE 7 DIAS APÓS O ENVENENAMENTO COM <i>LOXOSCELES</i> SP (SAMS <i>ET AL</i> , 2001).....	24
FIGURA 4: LESÃO CAUSADA POR <i>LOXOSCELES</i> SP EVIDENCIANDO ESPALHAMENTO GRAVITACIONAL (SAMS <i>ET AL</i> , 2001).	24
FIGURA 5: ESQUEMA ILUSTRATIVO DAS ETAPAS DE CONSTRUÇÃO DO ANTICORPO DE CADEIA ÚNICA.	34
FIGURA 6: MAPA DO VETOR PGEM T-EASY MOSTRANDO O SÍTIO DE INSERÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE E OS SÍTIOS DE RESTRIÇÃO DAS ENZIMAS <i>NOTI</i> E <i>NCOI</i>	36
FIGURA 7: MAPA DO VETOR PHEN 1, DIFERENCIADO DO VETOR PHEN-HIS APENAS PELA REGIÃO C-MYC TAG, CORRESPONDENTE À CAUDA DE 6 HISTIDINAS NO VETOR PHEN-HIS. O ESQUEMA EVIDENCIA OS SÍTIOS DE RECONHECIMENTO DAS ENZIMAS DE RESTRIÇÃO <i>NCOI</i> E <i>NOTI</i> QUE FORAM USADOS PARA A LIGAÇÃO. (HOOGENBOON <i>ET AL</i> , 1991).	38
FIGURA 8: MAPA DO VETOR PET28-A EVIDENCIANDO A LOCALIZAÇÃO DOS SÍTIOS DE RESTRIÇÃO DAS ENZIMAS <i>NOTI</i> E <i>NCOI</i>	39
FIGURA 9: PERFIL DE AMPLIFICAÇÃO DAS CADEIAS LEVE E PESADA. A: PADRÃO DE PESO MOLECULAR; B: PRODUTO DE PCR DA CADEIA VARIÁVEL PESADA (VH); E C: PRODUTO DE PCR DA CADEIA VARIÁVEL LEVE (VL).	44
FIGURA 10: MONTAGEM DO SCFV NA <i>ASSEMBLY</i> PCR. GEL DE AGAROSE 1,5% MOSTRANDO EM A: PADRÃO DE PESO MOLECULAR; B: CADEIA VARIÁVEL PESADA; C: CADEIA VARIÁVEL LEVE; E D: FRAGMENTO DE SCFV.	45
FIGURA 11: GEL DE AGAROSE 1,5% EVIDENCIANDO CLONES POSITIVOS AO INSERTO (SCFV) NAS LETRAS B, C, D E E.	45
FIGURA 12: SEQUÊNCIA PARCIAL DE NUCLEOTÍDEOS E DEDUZIDA DE AMINOÁCIDOS DO PLASMÍDEO PGEM-SCFV OBTIDA COM O PROGRAMA EXPASY (2013). NA SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS ESTÃO DESTACADOS EM VERDE OS SÍTIOS DE <i>NCOI</i> E <i>NOTI</i> , E NA SEQUÊNCIA DEDUZIDA DE	

AMINOÁCIDOS ESTÁ DESTACADO O PEPTÍDEO LIGANTE QUE CONECTA A PARTE C-TERMINAL DA REGIÃO VARIÁVEL DA CADEIA LEVE (K) À PARTE N-TERMINAL DA REGIÃO VARIÁVEL DA CADEIA PESADA	46
FIGURA 13: PESQUISA DE HOMOLOGIA EM BANCO DE DADOS UTILIZANDO O PROGRAMA BLASTX. OS VALORES DE HOMOLOGIA OBTIDOS NESSA PESQUISA FORAM: IDENTIDADE DE 67% E SIMILARIDADE DE 80%. A LINHA “QUERY” CORRESPONDE A SEQUÊNCIA PARCIAL DE AMINOÁCIDOS DEDUZIDA DO CLONE DE SCFV28A OBTIDO NESSE TRABALHO E “SBJCT” CORRESPONDE AO POLIPEPTÍDEO DO “BI-SCFV” ANTI-CD95 E ANTI-HMWG (NÚMERO DE ACESSO CAD69001 OU AJ544530). PARTE DO PEPTÍDEO LIGANTE ESTÁ REALÇADA EM AZUL.	46
FIGURA 14: REPRESENTAÇÃO GRÁFICA 2D DAS CADEIAS VARIÁVEIS LEVE (A) E PESADA (B) EM FORMATO “COLAR DE PÉROLAS” OBTIDA PELO PROGRAMA IMGT/V-QUEST, 2013. REGIÕES DE CRD ESTÃO DELIMITADAS ENTRE AMINOÁCIDOS EM QUADRADOS. PÉROLAS DESTACADAS COM LISTRAS REPRESENTAM AMINOÁCIDOS NÃO CORRESPONDENTES NO BANCO DE DADOS IMGT E AMINOÁCIDOS HIDROFÓBICOS ESTÃO REPRESENTADOS EM CÍRCULOS PREENCHIDOS PELA COR AZUL. 47	47
FIGURA 15: SEQUÊNCIA NUCLEOTÍDICA E AMINOACÍDICA DEDUZIDA DA PROTEÍNA SCFVLIMAB7, EVIDENCIANDO A LOCALIZAÇÃO DE REGIÕES DE FRAMEWORK (FR) E DE CDR.	49
FIGURA 16: PERFIL DE DIGESTÃO DOS PLASMÍDIOS PGEM-SCFV E PHEN-HIS. GEL DE AGAROSE A 1% MOSTRANDO EM A: PADRÃO DE PESO MOLECULAR; B: PARTE DO MATERIAL GENÉTICO DO VETOR PGEM (SETA BRANCA) LIBERANDO A SEQUÊNCIA DO SCFV (SETA PRETA); E EM C: O VETOR PHEN-HIS APÓS O CORTE COM AS ENZIMAS NCOI E NOTI. 49	49
FIGURA 17: SDS-PAGE 12,5% CORADO POR AZUL BRILHANTE DE COOMASSIE, EVIDENCIANDO EM A: PADRÃO DE PESO MOLECULAR; B: PRODUTO DA EXPRESSÃO DE CÉLULAS BL21 CONTENDO O VETOR PET28-A-SCFV; C: ALBUMINA BOVINA; D: PRODUTO DA EXPRESSÃO DE CÉLULAS BL21 NÃO TRANSFORMADAS	50
FIGURA 18: GEL DE ACRILAMIDA 12,5% CORADO POR COOMASSIE MOSTRANDO EM CANALETAS ÍMPARES: CÉLULAS BL21 NÃO TRANSFORMADAS; E PARES: CÉLULAS BL21 CONTENDO O VETOR PET28-A-SCFV. CANALETAS 1, 2, 7, 8, 15 E 16 COM 0 H DE EXPRESSÃO; 3, 4, 9, 10, 17 E 18 COM 3 H DE EXPRESSÃO E 5, 6, 11, 12, 19 E 20 COM 5 H DE EXPRESSÃO. CANALETAS DE 1 A 6: COM INDUÇÃO DE 1MM DE IPTG; 7 A 12: 0,7MM DE IPTG E; 15 A 20: 0,5 MM DE IPTG. CANALETA 13: PADRÃO DE PESO MOLECULAR; 14: IMUNOGLOBULINA G MURINA.	50
FIGURA 19: SDS-PAGE 12,5% COM COLORAÇÃO FEITA POR AZUL DE COOMASSIE. DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE UREIA FORAM TESTADAS PARA A SOLUBILIZAÇÃO DO SCFVLIMAB7. CANALETAS 1, 3, 6, E 8 MOSTRAM AS PARTES SOLÚVEIS DO PRODUTO DA EXPRESSÃO BACTERIANA RESUSPENSO EM TAMPÃO COM UREIA, ENQUANTO 2, 4, 7	

E 9 SÃO PARTES NÃO SOLÚVEIS (“PELLETIZADAS” APÓS CENTRIFUGAÇÃO). NAS CANALETAS 1 E 2: UREIA 2M; 3 E 4: UREIA 4M; 6 E 7: UREIA 6M E; 8 E 9: UREIA 8M. CANALETA 5: PADRÃO DE PESO MOLECULAR.	51
FIGURA 20: SDS-PAGE 12,5% COM COLORAÇÃO POR NITRATO DE PRATA, EVIDENCIANDO NAS CANALETAS 1 E 16: PADRÃO DE PESO MOLECULAR; 2 E 3: ELUIÇÃO COM IMIDAZOL 100MM; 3 E 4: IMIDAZOL 200MM; 5 E 6: IMIDAZOL 300MM; 7 E 8: IMIDAZOL 400MM; 9 A 16 E 18 A 21: ELUIÇÃO COM IMIDAZOL 500 MM.....	52
FIGURA 21: ENSAIO DE <i>WESTERN BLOT</i> COM REVELAÇÃO POR ECL, MOSTRANDO MEMBRANAS DE PVDF TRANSFERIDAS COM O PRODUTO DA EXPRESSÃO BACTERIANA CONTENDO O CLONE PET28-A-SCFV (A, B E C) E O PRODUTO DA EXPRESSÃO BACTERIANA DE CÉLULAS NÃO TRANSFORMADAS (D, E E F). EM A E D: MEMBRANAS FORAM TRATADAS SOMENTE COM O ANTICORPO ANTI-LI; B E E: MEMBRANAS INCUBADAS COM O VENENO BRUTO DE <i>L. INTERMEDIA</i> E O CONJUGADO ANTI-LI; E EM C E F: INCUBAÇÃO SOMENTE COM O ANTICORPO ANTI-HIS.....	52

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1: REATIVIDADE DA PROTEÍNA RECOMBINANTE SCFVLIMAB7 (EM CONCENTRAÇÕES DE 0,4 E 1 MG/POÇO) AO VENENO BRUTO DE <i>LOXOSCELES INTERMEDIA</i> (1 MG/POÇO) E AO ANTICORPO CONJUGADO À PEROXIDASE ANTI-HIS.....	53
--	----

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: REGISTROS DE NOTIFICAÇÕES CAUSADAS POR <i>LOXOSCELES</i> NO BRASIL, DE 2009 A 2012 (SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO – SINAN, 2012).	21
TABELA 2: INICIADORES ESCOLHIDOS PARA OBTENÇÃO DO CDNA DE LIMAB7	33
TABELA 3: INICIADORES USADOS PARA A AMPLIFICAÇÃO DAS CADEIAS LEVE E PESADA. REGIÕES SUBLINHADAS REPRESENTAM A SEQUÊNCIA CODIFICADORA DO LIGANTE PEPTÍDICO, REGIÕES EM ITÁLICO INDICAM SÍTIOS DE RESTRIÇÃO DAS ENZIMAS <i>NCOI</i> E <i>NOTI</i> . REPRESENTAÇÃO DE BASES NITROGENADAS: S (G/C), R (G/A), K (G/T), M (A/C), Y (C/T), W (A/T), H (A/C/T), B (C/G/T), V (A/C/G), D (A/G/T) E N (A/T/G/C).....	34
TABELA 4: INICIADORES USADOS PARA AMPLIFICAÇÃO DO PRODUTO DA <i>ASSEMBLY</i> PCR.....	35
TABELA 5: CONDIÇÕES DE UMA REAÇÃO PADRÃO DE AMPLIFICAÇÃO POR PCR	35
TABELA 6: SEQUÊNCIAS DOS INICIADORES M13 F, M13 R, PHEN R E PHEN F USADOS NO SEQUENCIAMENTO DOS PLASMÍDEOS PGEM-SCFV E PHEN-HIS-SCFV.....	37
TABELA 7: CONSTITUIÇÃO DOS GÉIS DE SEPARAÇÃO E CONCENTRAÇÃO USADOS NA ELETROFORESE.....	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

cDNA: DNA complementar

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DNTP: Desoxinucleotídeos

ELISA: *Enzyme linked immunosorbent assay*

h: Hora/horas

IPTG: Isopropil- β -D-tiogalactopyranosídeo

kDa: Quilodalton

M: Mol por litro

mL: Mililitro

mM: Milimol por litro

mRNA: RNA mensageiro

ng: Nanogramas

nm: Nanômetros

pb: Pares de base

PCR: Reação em cadeia da polimerase

pH: Potencial de hidrogênio iônico

SDS-PAGE: *Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*

RNA: Ácido ribonucléico

ug: Micrograma

uL: Microlitro

V: Volts

SUMÁRIO

1. REVISÃO DE LITERATURA	15
1.1 A neutralização de venenos e a soroterapia	15
1.2 O uso de anticorpos recombinantes.....	16
1.3 A molécula de scFv e sua produção	18
1.4 O gênero <i>Loxosceles</i> e o loxoscelismo	21
1.5 Manifestações clínicas do envenenamento	23
1.6 Composição do veneno.....	25
1.7 Tratamentos, vacinas e anti-venenos.....	27
1.8 Produção do LimAb7.....	29
2. OBJETIVOS.....	31
2.1 Objetivo geral	31
2.2 Objetivos específicos	31
3. MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1 Genótipo de linhagens celulares.....	32
3.2 Expansão dos hibridomas e extração do RNA.....	32
3.3 Obtenção do cDNA	32
3.4 Amplificação de cadeias variáveis leve e pesada	33
3.5 Clonagem em pGEM.....	35
3.6 Amplificação do scFv pelo vetor pGEM	36
3.7 Sequenciamento	37
3.8 Análise do sequenciamento	38
3.9 Clonagem nos vetores de expressão.....	38
3.10 Expressão	39
3.11 Purificação	40
3.12 Eletroforese e Coloração dos géis	40
3.13 <i>Western Blot</i>	41
3.14 ELISA.....	42
4. RESULTADOS.....	44
5. DISCUSSÃO	54
6. CONCLUSÕES	59
7. REFERÊNCIAS.....	60

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1 A neutralização de venenos e a soroterapia

São considerados animais peçonhentos os organismos que possuem um aparelho responsável pela inoculação, como presas, ossos, dentes ou agulhões, de substâncias cuja atividade farmacológica possa ser prejudicial à saúde humana. Neste grupo, os principais responsáveis por acidentes são abelhas, escorpiões, aranhas e serpentes (ESPINO-SOLIS *et al*, 2009). O número exato de envenenamentos causados por esses organismos não é conhecido e torna-se difícil sua previsão devido à grande quantidade de casos não notificados. No entanto, estima-se que, no mundo, ao menos 2,5 milhões de pessoas sejam envenenadas por serpentes todos os anos; 1,2 milhões por escorpiões; e só no Brasil, 19.634 por aranhas (LOVRECEK e TOMIC, 2011; e WARREL, 2012).

Tendo em vista que a peçonha tem como principal finalidade a captura de presas ou a defesa do animal, a composição do veneno é bastante variada. Este contém uma complexa mistura tanto de substâncias proteicas como não proteicas, podendo chegar a mil diferentes peptídeos de 1 a 10 kDa em algumas espécies de aranhas (MORGENSTERN e KING, 2013).

Devido a acidentes causados por infecções, intoxicações e envenenamentos, desde o final do século XIX a imunização passiva contra toxinas é estudada, levando ao desenvolvimento da primeira antitoxina contra o tétano por Emil von Behring e Shibasuro Kitasato em 1889. Esses estudos impulsionaram trabalhos como o de Phisalix e Bertrand em 1894, que demonstraram a atividade antitóxica do sangue de animais imunizados com o veneno da serpente *Vipera aspis* (LOVRECEK e TOMIC, 2011). No Brasil, os primeiros ensaios para a produção de antivenenos ofídicos foram realizados no início do século XX por Vital Brazil, um dos pioneiros a relacionar a eficácia do soro à sua especificidade (SANTANA e FARIA, 2005).

Apesar das inovações tecnológicas, atualmente, o princípio da produção de soros é o mesmo daquele de um século atrás. Inicialmente, o veneno que será utilizado nas imunizações é coletado, analisado bioquimicamente e avaliado em relação à presença de agentes estranhos. A fim de assegurar sua qualidade e

composição, recomenda-se um intervalo de até quatro semanas para cada coleta de veneno de um mesmo animal. Posteriormente, é realizada a imunização com doses crescentes do veneno em animais de grande porte, geralmente equídeos, dos quais são feitas coletas estéreis do plasma sanguíneo a cada quatro semanas após o período de imunização (LOVRECEK e TOMIC, 2011).

Apesar da eficácia comprovada da soroterapia, este não é um tratamento sem riscos. Já é bem relatado que a administração de anticorpos heterólogos a seres humanos pode levar a reações de hipersensibilidade devido ao reconhecimento de moléculas de composição estranha pelo sistema imunológico. Acredita-se que essa característica possa ser diminuída com uma etapa de fragmentação dos anticorpos por digestão enzimática para a eliminação da região Fc do anticorpo (Figura 1A), considerada altamente imunogênica. Durante a digestão enzimática com pepsina, parte da região constante do anticorpo é retirada com a formação de fragmentos Fc e F(ab')₂, sendo somente o segundo um componente da etapa final de produção do soro na maioria dos fabricantes (LOVRECEK e TOMIC, 2011; e ESPINO-SOLIS *et al* 2009).

1.2 O uso de anticorpos recombinantes

Mesmo após os avanços de um século da soroterapia, a utilização de soros heterólogos produzidos a partir da imunização de equídeos ainda é restrita pelo temor das reações adversas que podem ocorrer. Os soros recomendados em casos de envenenamentos causados por aranhas do gênero *Loxosceles* tanto pelo Ministério da Saúde (2001) quanto pelo Centro de Produção e Pesquisa em Imunobiológicos (CPPI) contêm fragmentos de anticorpos F(ab')₂ heterólogos de tamanho relativamente grande (aproximadamente 100 kDa), sendo este e a presença da região constante do anticorpo em metade de sua composição os principais fatores para a geração de reações imunológicas. Em um estudo feito na cidade de São Paulo, reações imediatas à administração do soro anti-loxoscélico foram vistas em 6,5% a 20% dos pacientes (PAULI *et al*, 2006). O reconhecimento dessas moléculas heterólogas é feito principalmente por IgEs, e resultam na degranulação de basófilos e mastócitos, resultando na liberação de fatores inflamatórios. Dentre as manifestações leves provocadas pelo reconhecimento imunológico do soro estão rubor cutâneo, urticária, náuseas, vômito e crise

asmatiforme, assim como reações mais graves são representadas por arritmias cardíacas, hipotensão arterial, choque anafilático e quadro obstrutivo das vias respiratórias, apesar destas últimas serem menos frequentes. Reações tardias, como a doença do soro, também podem estar presentes. Neste caso, os sintomas de urticária local ou generalizada, febre e artralgia aparecem de 1 a 15 dias após a administração do antiveneno. Ainda, doses complementares de soro podem ser necessárias, aumentando o risco dessas reações (LOVRECEK e TOMIC, 2011; e THEAKSTON *et al*, 2003). Somado a esses fatores, a soroterapia como é realizada atualmente é um tratamento oneroso e sacrificante para um grande número de animais, já que cada novo soro precisa ser testado quanto à sua potência frente ao veneno. Como exemplo, tem-se o soro antiloxoscélico, cuja potência é testada pela eficiência de neutralização de reações dermonecróticas em coelhos (ALMEIDA *et al*, 2008).

Como uma maneira de evitar tais problemas, acredita-se que a utilização de anticorpos recombinantes seja uma solução viável, já que sua construção em sistemas bacterianos é capaz de sintetizar e expressar grandes quantidades de anticorpos contra vários antígenos, o que diminuiria o custo da produção e, de acordo com sua construção, evitaria o desencadeamento de respostas imunológicas. A carga, solubilidade e estabilidade do anticorpo recombinante também podem ser alteradas de acordo com sua construção, assim como sua especificidade e reconhecimento ao antígeno alvo (AHMAD *et al*, 2012).

Essa tecnologia consiste na obtenção de fragmentos de anticorpos proteicos utilizando DNAs codificantes de imunoglobulinas como molde e células procarióticas para sua produção. Dependendo da construção (Figura 1), o anticorpo recombinante pode conter apenas as regiões variáveis leve e pesada do anticorpo unidas por um ligante peptídico (scFv); duas cadeias variáveis idênticas unidas (*Nanobodies* bivalentes); scFvs biespecíficos unidos enfileirados (*tandem*); ou podem ser formadas moléculas quiméricas, como a construção *Nanobody-human Fc*, na qual a adição de uma região Fc humana a um scFv ou *nanobody* heterólogo diminui consideravelmente a chance de reconhecimento pelo sistema imune humano (ESPINO-SOLIS *et al*, 2009).

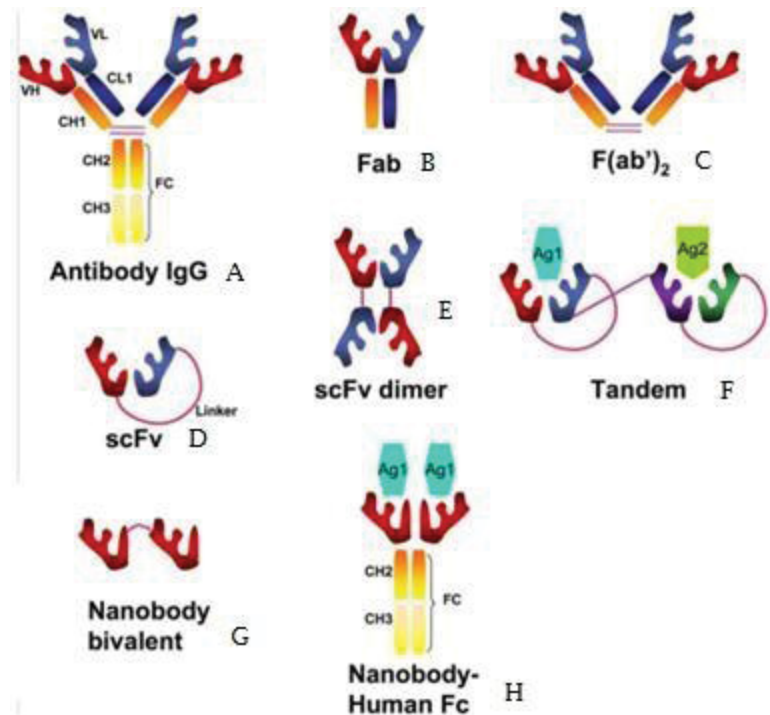


Figura 1: Diferentes construções de fragmentos de anticorpos: (A) Imunoglobulina original; (B) Fragmento Fab; (C) Fragmento F(ab')₂; (D) *Single-chain fragment variable*; (E) Dímero de scFv; (F) ScFvs em tandem; (G) Nanobodies bivalentes; (H) Anticorpo quimérico *nanobody-human Fc*. Cadeias leves são representadas na coloração azul e cadeias pesadas em amarelo, laranja e vermelho. Adaptado de Espino-Solis *et al*, 2009.

Diversos anticorpos recombinantes humanos, murinos ou quiméricos já foram aprovados como ferramentas terapêuticas para humanos pelo órgão *Food and Drug Administration* (FDA) nos Estados Unidos. Podem ser usados como marcadores moleculares ou no tratamento de doenças crônicas e do câncer (ESPINO-SOLIS *et al*, 2009). Atualmente, estudos como o de Oliveira *et al*, (2009), com a neutralização de enzimas fosfolipases; e Amaro *et al* (2011), com a neutralização da enzima Ts1 de *Tityus serrulatus*, mostram que anticorpos recombinantes também são capazes de neutralizar efeitos tóxicos tanto de venenos ofídicos como escorpiônicos.

1.3 A molécula de scFv e sua produção

Os fragmentos variáveis de cadeia única, ou scFvs (*single-chain variable fragments*), são os menores fragmentos gerados a partir de um anticorpo capazes de manter a especificidade, afinidade de ligação e propriedades de reconhecimento de um anticorpo inteiro. Possuem baixo peso molecular (aproximadamente 25 kDa)

e são construídos somente a partir de engenharia genética. Devido ao seu pequeno tamanho, conseguem se difundir com facilidade em tecidos e na corrente sanguínea, chegando ao tecido alvo rapidamente e evitando o reconhecimento por anticorpos do paciente, minimizando reações indesejadas. A construção de um scFv também pode ser considerada como uma etapa na construção de outros anticorpos recombinantes, já que a partir destes podem ser originados tanto scFvs biespecíficos como anticorpos quiméricos e *diabodies*. Para a produção de scFvs com a melhor atividade, questões como a carga, conformação, flexibilidade e comprimento do ligante devem ser consideradas, e podem ser alteradas para cada aplicação específica (YUASA *et al*, 2011).

São constituídos por um domínio de cadeia variável leve (VL) e um domínio de cadeia variável pesada (VH) separadas por um peptídeo espaçador flexível. Essa construção pode variar tanto na orientação das cadeias como no comprimento e composição do ligante, contendo de 1 a 20; ou 35 a 40 resíduos de aminoácidos. Um importante fator na construção de scFvs é o uso de sequências proteicas já conhecidas no ligante peptídico, que não afetem a estabilidade e as propriedades do scFv *in vivo*. Raag e Whitlow (1995) afirmam que o peptídeo ligante deve ser rico em aminoácidos glicina e serina, para que seja mantida a flexibilidade da molécula, assim como é sugerida a presença de lisinas, já que estas podem favorecer sua solubilidade. Alterações no tamanho do ligante também são essenciais para a manutenção da estrutura do scFv e da sua capacidade de oligomerização. Quanto menor seu comprimento, maior a chance de pareamento entre regiões de complementaridade dos domínios variáveis de dois ou mais scFvs, resultando na formação de dímeros ou oligômeros. A vantagem na construção desses oligômeros está relacionada com o aumento do tempo de retenção no tecido alvo e com a formação de diversos sítios de reconhecimento ao antígeno, aumentando sua avidéz quando comparados ao monômero de scFv (KNAPPIK e BRUNDIERS, 2009).

Uma das formas de obtenção das sequências hipervariáveis dos anticorpos de cadeia única é a partir da amplificação do cDNA de imunoglobulinas de esplênócitos de animais imunizados. Devido à alta variabilidade de sequências de DNA de imunoglobulinas, autores como Okamoto *et al* (2004) e Sun *et al* (2012) defendem a utilização de iniciadores degenerados para a obtenção das sequências de DNA das cadeias variáveis de imunoglobulinas. Esses iniciadores permitem a obtenção de uma ampla variedade e cobertura de amplificação das sequências. A

obtenção de uma quantidade significativa de diferentes RNAs ou DNAs codificantes de imunoglobulinas resulta na formação de bancos de anticorpos (que podem ou não ser humanos) e que podem tanto ter origem poli como monoclonal. A técnica mais utilizada para a obtenção de scFvs a partir de bancos é chamada de *phage display*. As imunoglobulinas (ou seus fragmentos) quando traduzidas são expressas na superfície do capsídeo de bacteriófagos, permitindo que sejam testadas por ciclos de *biopanning* para a seleção dos anticorpos mais reativos frente aos antígenos de interesse quando avaliados em imunoensaios. Apesar de ser uma técnica que permite a obtenção de uma grande variedade de anticorpos, a chance de obtenção de um scFv ou anticorpo recombinante que reconheça um antígeno específico com alta afinidade é relativamente baixa, especialmente em bancos não imunes.

A segunda via comumente explorada para obtenção de scfvs baseia-se no uso de hibridomas secretores de anticorpos monoclonais para a obtenção das sequências de imunoglobulinas. A vantagem no uso de anticorpos monoclonais consiste na manutenção do paratopo da imunoglobulina original, de sua especificidade (MOUSLI *et al*, 1999 e AUBREY *et al*, 2004), e assim, da capacidade protetora equivalente em caso de envenenamentos. A construção de um scFv a partir de um anticorpo monoclonal também pode ser feita em um sistema de expressão bacteriana, de modo que, após a obtenção da sequência do DNA codificante do scFv, esta pode ser inserida em um plasmídeo comercial apropriado para expressão proteica. É importante que esse plasmídeo contenha características como um gene de resistência a antibióticos, operador e promotor Lac induzível por IPTG, origem de replicação de alto número de cópias, e uma cauda peptídica curta usada para a detecção e purificação do anticorpo. Em seguida, o plasmídeo deve ser clonado em um sistema bacteriano, geralmente na linhagem de expressão *Escherichia coli* BL21 DE3, na qual, altos níveis de expressão podem ser obtidos, chegando a até 20 mg de proteína purificada para cada 1000 mL de cultura bacteriana. As células podem então ser lisadas para a liberação do conteúdo peri ou citoplasmático contendo os anticorpos, os quais são purificados por cromatografia de afinidade e utilizados como os anticorpos monoclonais tradicionais (KNAPPIK e BRUNDIERS, 2009).

Em alguns estudos, os scFvs também foram associados a uma alta penetração em tumores *in vivo*, uma alta capacidade de ligação a proteínas,

receptores, antígenos tumorais ou outros anticorpos, sendo assim bons vetores para marcação celular e estudos de imagem (OLAFSEN e WU, 2010). Tendo em vista seu baixo peso molecular e rápida difusão no tecido, acredita-se que sejam candidatos ideais para a neutralização de substâncias tóxicas provenientes de envenenamento, já que a ligação de um scfv específico ao sítio de ligação de uma molécula tóxica inativaria seu sítio ativo, e consequentemente inibiria seu efeito prejudicial (ARYA *et al*, 2013).

Desde 2001 já é descrita a construção de scFvs a partir de anticorpos monoclonais contra toxinas escorpiônicas. O scFv9C2, construído a partir de iniciadores específicos para regiões hipervariáveis de imunoglobulinas e específico para a toxina Aahl do escorpião *Androctonus australis*, foi um passo inicial e importante no desenvolvimentos de anticorpos recombinantes contra toxinas aracnídicas (DEVAUX *et al*, 2001).

1.4 O gênero *Loxosceles* e o loxoscelismo

O loxoscelismo é a forma de araneísmo mais importante em alguns países e a terceira causa de envenenamento por animais peçonhentos no Brasil (PAULI *et al*, 2009). Dados disponibilizados pelo SINAN (Sistemas de informação de agravos de notificação) apontam que somente no ano de 2011, o número de notificações de acidentes provocados por aranhas *Loxosceles* chegou a 8.089 (Tabela 1) em todo o país, sendo grande parte dos acidentes não notificados.

TABELA 1: REGISTROS DE NOTIFICAÇÕES CAUSADAS POR *Loxosceles* NO BRASIL, DE 2009 A 2012 (SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO – SINAN, 2012).

Ano	Número de Notificações
2009	8.472
2010	7.980
2011	8.089
2012	4.871 (dados parciais)

Aranhas do gênero *Loxosceles* (também denominadas aranhas marrom) são invertebrados artrópodes pertencentes à classe Arachnida, ordem Araneae e família

Sicariidae. Seus *habitats* mais comuns são tocas e frestas quando na natureza, e em porões, sótãos, atrás de livros, construções e armários quando no ambiente intradomiciliar. Essas aranhas possuem hábitos noturnos, não apresentam um comportamento agressivo e as picadas ocorrem geralmente devido à pressão acidental das quelíceras na pele das vítimas. Sua fácil adaptação a ambientes sinantrópicos se torna uma preocupação, já que podem ser encontradas em roupas e sapatos, aumentando a chance de acidentes em humanos e em animais domésticos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001; e ISBISTER e FAN, 2011).

Possuem de 1 a 5 centímetros (incluindo pernas) de comprimento e seu reconhecimento se dá pela identificação de uma região mais pigmentada no cefalotórax, que possui forma de violino (Figura 2). Como essa região nem sempre pode ser vista com facilidade devido à variação na coloração entre os espécimes, outro modo de reconhecimento é a presença de três pares de olhos formando um “U” na região do cefalotórax, apesar desta não ser uma característica exclusiva do gênero (VETTER e SWANSON, 2006; e CHAIM *et al*, 2011).



Figura 2: *Loxosceles* sp com padrão de pigmentação em forma de violino no cefalotórax (MOREIRA, 2008).

O gênero *Loxosceles* (Heineken & Lowe, 1832) compreende mais de 100 espécies distribuídas em zonas tropicais e temperadas das Américas, Europa, Ásia e Austrália (KALAPOTHAKIS *et al*, 2012). Os primeiros casos na América do Sul, onde é considerado um problema de saúde pública, foram descritos no Chile, Peru, Brasil, Argentina e Uruguai no início do século XX

(ISBISTER e FAN, 2011). No Brasil, foram primeiramente descritas em 1891, mas somente em 1954 foram consideradas como importantes causadoras de acidentes (PAULI *et al*, 2009). Atualmente, sabe-se que o estado do Paraná é foco de pelo menos quatro espécies de *Loxosceles* (MARQUES-DA-SILVA e FISCHER, 2005) e compreende a maior parte dos acidentes provocados por aranhas marrom, com uma média de 2.577 notificações registradas ao ano (CHENET *et al*, 2009).

Dentre as espécies de *Loxosceles* comumente citadas pela capacidade de gerar o efeito dermonecrótico ou por sua grande distribuição e contato com ambientes humanos, são bem conhecidas: *L. laeta*, *L. gaucho*, *L. reclusa*, *L. deserta*, *L. rufescens* e *L. intermedia*. Cada espécie tem características e distribuições próprias, no entanto, é importante ressaltar que dentre as espécies prevaletentes no Brasil e no estado do Paraná, *L. intermedia* (Mello-Leitão, 1934) é a mais abundante (FELICORI *et al*, 2009).

1.5 Manifestações clínicas do envenenamento

Quando presentes, as manifestações do envenenamento por aranhas marrom são classificadas em loxoscelismo cutâneo ou loxoscelismo visceral, este último também chamado sistêmico ou hemolítico. As manifestações cutâneas, segundo Pauli *et al* (2006), representam 67% a 100% dos casos, e resultam em dor moderada e eritema, podendo evoluir a lesões necróticas (Figura 3) de crescimento lento e gradual no local da picada. Devido a efeitos deletérios ao endotélio vascular, o veneno pode indiretamente provocar agregação plaquetária, coagulação intravascular disseminada, vasodilatação, aumento da permeabilidade sanguínea, enfraquecimento dos vasos e até hemorragia (VETTER e SWANSON, 2006).



Figura 3: Lesão de 7 dias após o envenenamento com *Loxosceles* sp (SAMS *et al*, 2001).

Nos dias que sucedem a picada pode ocorrer uma grande infiltração de neutrófilos na derme e lesões dermonecroticas são evidenciadas em até 72h; estas ou são caracterizadas pela formação de bolhas e pústulas, ou evoluem para uma escara de lenta cicatrização. No local da picada também há a formação de uma região de coloração vermelho-arroxeadada, onde o paciente costuma sentir dor e sensibilidade (ISBISTER e WAN, 2011; CATALÁN *et al*, 2011). No loxoscelismo cutâneo também se observa inflamação, isquemia e espalhamento gravitacional da lesão na pele (Figura 4), sendo mais grave em pessoas obesas, uma vez que enzimas do veneno destroem com maior rapidez tecidos adiposos pouco vascularizados (VETTER, 2008).



Figura 4: Lesão causada por *Loxosceles* sp evidenciando espalhamento gravitacional (SAMS *et al*, 2001).

Manifestações sistêmicas são raras, representam risco de vida especialmente tratando-se de crianças, e correspondem de 0 a 30% dos casos (PAULI *et al*, 2006). Têm como principal característica a anemia hemolítica intravascular aguda e a partir de sete dias após o envenenamento já é possível observar a diminuição da concentração de hemoglobina do paciente (ISBISTER e FAN, 2011). Também podem aparecer distúrbios hematológicos como coagulação intravascular disseminada, rabdomiólise, hematúria,

hemoglobinúria e trombocitopenia, assim como sintomas de cefaléia, náusea, mialgia, fraqueza, vômitos e anemia hemolítica. Em casos mais graves, manifestações sistêmicas podem levar à falência renal e até mesmo à morte do paciente (FELICORI *et al*, 2009).

1.6 Composição do veneno

A composição do veneno de *Loxosceles* é uma complexa mistura de substâncias biologicamente ativas, podendo conter sais inorgânicos, pequenos peptídeos, neurotoxinas e proteínas de alta ou baixa massa molecular. Apesar de similar em muitas sequências peptídicas dentre as diferentes espécies, pode variar bastante quanto ao grau de toxicidade e potência do veneno, o que pode influenciar no estado clínico do paciente e na severidade do acidente.

O veneno das aranhas *Loxosceles* pode conter fosfolipases, serinoproteases, metaloproteases e hialuronidases, dentre outras proteínas. Acredita-se que as metaloproteases sejam as responsáveis pela agregação plaquetária devido à destruição da fibronectina, uma glicoproteína que se liga tanto a receptores da membrana celular quanto à matriz extracelular presente nos capilares sanguíneos (CHAIM *et al*, 2011). Já as hialuronidases estão relacionadas à ação gravitacional encontradas nas lesões loxoscélicas, já que estas podem degradar parte da matriz extracelular e permitir o espalhamento das proteínas do veneno para tecidos e locais adjacentes à picada. Serinoproteases também estão presentes no veneno, e apesar de sua função no envenenamento ainda não ser clara, possuem atividades gelatinolíticas quando ativadas por tripsina, contribuem na destruição do tecido e interferem na coagulação sanguínea e fibrinólise (GREMSKI *et al*, 2010 e CHAIM *et al*, 2011).

Em relação ao tamanho das proteínas de *L. intermedia*, Veiga *et al* (2000) encontraram proteínas que variavam de 5 a 850 kDa, considerando as de alto peso molecular (de 60 a 850 kDa) pobremente expressas. Sabe-se que algumas podem exercer atividades gelatinolíticas, caseinolíticas ou fibrinogenolíticas, mas a maioria ainda não tem seu papel claramente comprovado na toxicidade, indicando também, que muitos efeitos do veneno

necessitariam de uma ação conjunta de várias proteínas (BÁRBARO *et al*, 2005).

Alguns estudos (VAN DEN BERG *et al*, 2012; e TAMBOURGI *et al*, 2006) relacionam diretamente a ação dermonecrótica do veneno com a ação do sistema complemento e a presença de leucócitos polimorfonucleares (PMN), cuja presença agrava o quadro de inflamação e contribui para a destruição do tecido. Já a relação entre a ação de leucócitos PMN e sintomas sistêmicos é controversa, visto que em casos de insuficiência renal ou nefrotoxicidade, números elevados de leucócitos PMN ou de imunoglobulinas nos rins não são encontrados, o que pode indicar uma ação específica e localizada do veneno nesses órgãos (CHAIM *et al*, 2006).

Dentre as proteínas envolvidas com a toxicidade do veneno, as proteínas da família Loxtox, em especial a enzima esfingomielinase D (SMD), de aproximadamente 32 kDa, são consideradas componentes chave para o desencadeamento da dermonecrose (FELICORI *et al*, 2009 e APPEL *et al*, 2008).

As enzimas esfingomielinases-D (SMD) ou fosfolipases-D são enzimas relacionadas à quebra ou hidrólise de esfingomielinas e glicerofosfolipídeos de membrana e correspondem a 16,4% das sequências presentes nas glândulas de veneno de algumas espécies de *Loxosceles*. As esfingomielinas são importantes componentes estruturais de membranas biológicas eucarióticas, junto a fosfolipídeos, glicolipídeos e algumas proteínas transmembranas. (GOMES *et al*, 2011). Sua hidrólise provoca a liberação de ceramida-1-fosfato, esfingosina e esfingosina-1-fosfato, que podem influenciar em funções celulares como apoptose, envelhecimento e desenvolvimento celular. Ainda, acredita-se que alterações nos níveis de ceramida-1-fosfato possam afetar processos como fagocitose, atividade de canais iônicos, inflamação, sobrevivência celular e tumorigênese (STOCK *et al*, 2012). A hidrólise de lisofosfatidilcolina pelas fosfolipases também gera um importante mediador lipídico, o ácido lisofosfatídico, ou LPA, o qual é responsável pela hiperpermeabilidade vascular, agregação plaquetária e respostas pró-inflamatórias. A capacidade de produzir hemólise, coagulação intravascular, infiltração de neutrófilos e lesão necrótica também é associada à ação das esfingomielinases (STOCK *et al*, 2012 e CHAIM *et al*, 2011).

1.7 Tratamentos, vacinas e anti-venenos

Até hoje, o tratamento mais eficaz para o loxoscelismo ainda é discutível, principalmente quando é levada em consideração a dificuldade de identificação da espécie responsável pelo acidente, assim como o tempo desde a picada até a procura por assistência médica. Vários fatores devem ser considerados para a verdadeira melhora do quadro do paciente e para a administração do melhor tratamento, mas principalmente: o tempo decorrido entre o envenenamento e posterior aplicação do tratamento; a condição do paciente e a resposta gerada pelo mesmo; a efetividade, validade e potência da droga administrada; a presença de outras infecções; a fase e tipo de loxoscelismo; e ainda administração conjunta de outros medicamentos (PAULI *et al*, 2006).

Dentre os tratamentos já recomendados estão: o uso de compressas, vasodilatadores, anti-histamínicos, realização de excisão cirúrgica, transfusões sanguíneas, diálises, assim como uso de antivenenos. Muitos protocolos propostos também incluem soluções caseiras e não têm sua eficácia comprovada. Alguns tratamentos têm efeitos colaterais sérios e outros são dolorosos, como a excisão de pele ou amputação, que podem ser mais graves que a própria lesão causada pelo envenenamento (ISBISTER e FAN, 2011; e PAULI *et al*, 2006).

Outra forma de terapia, envolvendo o uso de tetraciclina para a inibição de metaloproteases foi estudada por Paixão-Cavalcanti *et al* (2007). As metaloproteinases estariam envolvidas no recrutamento de linfócitos para o tecido, e a ação da tetraciclina poderia alterar a conformação dessas proteínas, diminuindo sua atividade.

O uso de dapsona ou corticoides também já foi relatado. O primeiro usado como um modulador da resposta inflamatória (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001), já que evitaria a migração e infiltração de neutrófilos no local da picada, um dos principais fatores para o desenvolvimento da escara dermonecrótica. Já a administração de corticosteroides seria direcionada para evitar efeitos sistêmicos como a falência renal ou hemólise, principalmente em crianças.

Estudos de vacinação através de proteínas recombinantes também foram iniciados com Kalapothakis *et al* (2002), utilizando a proteína recombinante LiD1, assim como por Felicori *et al* (2009), através do uso de peptídeos sintéticos.

Apesar das diferentes intervenções propostas, o uso de antivenenos é o tratamento mais usado no Brasil e considerado o de melhor resultado desde que administrado poucas horas após a picada (PAULI *et al*, 2006). Uma grande vantagem do uso de soros ou antivenenos é a possibilidade de direcionar o tratamento às espécies causadoras, o que não ocorre nas demais formas de terapia. Atualmente, no estado do Paraná, o Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos é o responsável pela fabricação do soro antiloxoscélico (SAL), que contém anticorpos obtidos pela imunização de equinos com quantidades equivalentes dos venenos de *L. intermedia*, *L. gaucho* e *L. laeta* (BRAZ *et al*, 1999). Quando o gênero ou a espécie causadora do acidente não são identificados, pode ser utilizado o soro antiaracnídico (SAA) disponibilizado pelo Instituto Butantã, produzido mediante a imunização de animais também com quantidades equivalentes dos venenos de *Loxosceles gaucho*, *Phoneutria nigriventer* e *Tytilus serrulatus* (ALMEIDA *et al*, 2008).

No Brasil, o Ministério da saúde preconiza o emprego de antivenenos no tratamento de lesões moderadas a graves, entretanto, é necessário considerar o tempo decorrido após a picada até a sua utilização. É conhecida a alta eficiência de neutralização do soro até poucas horas (entre 6 a 12 horas) após o envenenamento, tendo sua capacidade de neutralização diminuída com o tempo (PAULI *et al*, 2006).

Mesmo assim, alguns grupos defendem o uso de antivenenos até bastante tempo após a picada (até no máximo 72 horas), já que anticorpos circulantes também evitariam o espalhamento da toxina e a formação de efeitos sistêmicos (ISBISTER e FAN, 2011). Hogan *et al* (2004) defendem que além de evitar complicações mais graves como a insuficiência renal, hemólise, e a coagulação intravascular disseminada, o emprego do soro também reduziria o tamanho da lesão dermonecrótica e diminuiria o tempo de recuperação do paciente (PAULI *et al*, 2009).

Uma desvantagem em sua produção refere-se à pouca especificidade dos anticorpos do soro em relação às regiões mais antigênicas do veneno.

Como as imunizações são feitas utilizando-se o veneno bruto, parte da resposta imune dos animais usados é direcionada a proteínas pouco antigênicas ou de baixa toxicidade. Alguns autores (ALMEIDA *et al*, 2008) já propuseram a produção de soros equinos imunizados não só com o veneno bruto de *Loxosceles* sp, mas também com proteínas esfingomielinases-D recombinantes. Entretanto, até então, não houve resultados conclusivos sobre a superioridade do novo soro antiloxoscélico em relação ao antigo. Autores como Chow e Casadevall (2012) e Lovrecek e Tomic (2011) ressaltam que o uso de anticorpos monoclonais também pode ser uma ferramenta na produção de neutralizadores de venenos, e que talvez no futuro, possam substituir a produção de soros heterólogos.

1.8 Produção do LimAb7

Em um estudo realizado por Alvarenga *et al* (2003) foram produzidos 13 anticorpos monoclonais contra a fração dermonecrótica (DNF) do veneno de *Loxosceles intermedia*, dos quais, 12 reconheceram o veneno ou a DNF quando testados por ELISA e *Western Blot*, reagindo com proteínas de 32 a 35 kDa. Essa faixa de tamanho corresponde à família Loxtox e a proteínas com atividade de esfingomielinases do veneno, as quais são consideradas como as principais indutoras da ação necrótica e hemolítica. Dentre os anticorpos obtidos, o anticorpo monoclonal LimAb7 mostrou uma alta reatividade e reconhecimento dessas proteínas, levando a uma neutralização total do efeito necrótico quando coelhos foram desafiados com 10 ug do veneno bruto de *L. intermedia* (Alvarenga *et al*, 2003).

Em um estudo realizado por Moura *et al* (2011), utilizando o método de *phage display*, foi feita a identificação de epítopos reativos ao anticorpo LimAb7 em proteínas dermonecróticas recombinantes de *L. intermedia* (LiD1). Nesse trabalho, foi observado que ao interagir com um epítipo descontínuo compartilhado entre várias enzimas de 29 a 36 kDa do veneno bruto, o anticorpo LimAb7 é capaz de prevenir, por impedimento estérico, a ligação de enzimas esfingomielinases a seus sítios ativos.

Dado o potencial neutralizante desse anticorpo e das vantagens de produção de anticorpos de cadeias únicas (scFvs), é proposto nesse trabalho a construção de um scFv a partir do hibridoma murino LimAb7 e a avaliação de sua reatividade frente a toxinas loxoscélicas.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Obtenção de um anticorpo de cadeia única (scFv) capaz de reconhecer especificamente toxinas do veneno de *Loxosceles intermedia* a partir do hibridoma LimAb7.

2.2 Objetivos específicos

- Construir um anticorpo de cadeia única a partir do hibridoma LimAb7;
- Avaliar o melhor vetor para a expressão da molécula de scFv;
- Aperfeiçoar condições de expressão e purificação do scFvLimAb7;
- Caracterizar a molécula de scFv em sua forma solúvel;
- Avaliar o reconhecimento da proteína scFvLimAb7 frente a toxinas *loxoscélicas*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Genótipo de linhagens celulares

Estirpes bacterianas	Fabricante
<ul style="list-style-type: none"> • BL21 Star [™](DE3) One Shot[®]: F⁻, ompT, hsdSB (r_B- m_B⁺), dcm, gal, nre131 (DE3) • XL1-Blue Stratagene: recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacI^qΔM15 Tn10 (Tetr)]. 	Invitrogen Stratagene

3.2 Expansão dos hibridomas e extração do RNA

Hibridomas secretores do anticorpo LimAb7, previamente preparados por Alvarenga *et al* (2003), foram cultivados em meio RPMI 1640 Cultilab adicionado de L-glutamina 1%, soro fetal bovino 10%, penicilina 100 U/ml, streptomicina 10 ug/ml e ofloxacina 40 ug/mL

O RNA dos hibridomas foi extraído a partir de um cultivo (de aproximadamente 10⁷ células) previamente lavado em PBS e adicionado a 8 ml do reagente TRIzol[®] (Invitrogen). Um mililitro do lisado foi adicionado a 250 uL de clorofórmio e centrifugado a 10.000 x g por 20 minutos. A fase aquosa superior foi precipitada em isopropanol e o *pellet* formado foi resuspenso em água ultrapura (Invitrogen[™]) livre de RNase. Após a confirmação da qualidade do RNA em gel de agarose 1%, foram feitas seis reações de transcriptase reversa, utilizando diferentes iniciadores, de acordo com o isotipo de IgG a ser amplificado.

3.3 Obtenção do cDNA

Foi escolhido o iniciador RT1 (Tabela 2) para amplificação do isotipo kappa (Cκ) e RT2 para isotipo lambda (Cλ) de cadeia leve. Também foram utilizados os iniciadores RT3, RT4, RT5 e RT6, correspondendo respectivamente aos isotipos γ1, γ2a, γ2b, γ3 de cadeia pesada de imunoglobulinas murinas. Para cada reação, foram usados aproximadamente 500 ng de mRNA para cada 200 unidades de transcriptase reversa

SuperScript™ II (Invitrogen™) e 40 unidades de inibidor de RNase (Invitrogen™).

As reações contendo os iniciadores (25pmol), o RNA e 2 µl de dNTP 20 mM foram incubadas a 65°C por 5 minutos e 1 minuto a 4°C. Posteriormente foi acrescentado à reação 1 µl de DTT (ditiotretol) 5mM, inibidor de RNase, tampão *First-Strand Buffer* e transcriptase reversa *SuperScript™ II*, resultando em uma reação de volume final de 20 µl. Em seguida, as misturas foram deixadas a 50°C por 60 minutos.

TABELA 2: INICIADORES ESCOLHIDOS PARA OBTENÇÃO DO CDNA DE LIMAB7.

Iniciador	Cadeia correspondente	Sequência
RT1	Ck	5'-TG GTGGGAAGATGGATACAG-3'
RT2	Cλ	5'-AGGTGGAAACATGGTGAGTGT-3'
RT3	Cγ1	5'-TAGCCCTTGACCAGGCATCC-3'
RT4	Cγ2a	5'-TAACCCTTGACCAGGCATCC-3'
RT5	Cγ2b	5'-CAGGGATCCAGAGTTCCAAG-3'
RT6	Cγ3	5-TAGCCTTTGACAAGGCATCC-3'

A partir dos produtos obtidos, foi realizada uma reação de amplificação padrão de PCR com 30 ciclos (Tabela 5), utilizando 1/4 do produto obtido na reação anterior como molde. Os ciclos usados tiveram como fase de desnaturação 94°C a 1 minuto, 55°C a 1 minuto como fase de anelamento e 72°C por 2 minutos como fase de extensão. Foram escolhidas misturas de iniciadores degenerados (OKAMOTO *et al*, 2004) direcionados à amplificação das regiões de determinação de complementaridade (CDR). Nessa etapa, objetivou-se amplificar separadamente as cadeias variáveis leve e pesada, totalizando duas reações. Reações com amplificação positiva foram confirmadas em gel de agarose 2%.

3.4 Amplificação de cadeias variáveis leve e pesada

Posteriormente, três etapas (Figura 5) de reações de PCR foram feitas: a primeira (Reação 1, tabela 5) consistiu na determinação da melhor combinação de iniciadores (Tabela 3) para a amplificação dos genes da cadeia variável leve e pesada, dentre as 28 combinações descritas por Okamoto *et al*,

2004.

TABELA 3: INICIADORES USADOS PARA A AMPLIFICAÇÃO DAS CADEIAS LEVE E PESADA. REGIÕES SUBLINHADAS REPRESENTAM A SEQUÊNCIA CODIFICADORA DO LIGANTE PEPTÍDICO, REGIÕES EM ITÁLICO INDICAM SÍTIOS DE RESTRIÇÃO DAS ENZIMAS *NCOI* E *NOTI*. REPRESENTAÇÃO DE BASES NITROGENADAS: S (G/C), R (G/A), K (G/T), M (A/C), Y (C/T), W (A/T), H (A/C/T), B (C/G/T), V (A/C/G), D (A/G/T) E N (A/T/G/C).

Iniciador	Sequência
VL5'2	5'-cct ttc tat gcg gcc cag ccg gCC ATG Gcc GAY ATT NWK MTV AHD CAG TC-3'
VL3'1	5'-acc aga gcc gcc gcc gcc gct acc acc acc CCG TTY NAK YTC CAR CTT DG-3'
VH3'1	5'-cgg cac cgg cgc acc tGC GGC CGC YGA RGA RAC DST GAS MRK RGT-3'
VH5'2	5'-agc ggc ggc ggc ggc tct ggt ggt ggt gga tcc SAG GTY CAR CTB CAR CAR TC-3'

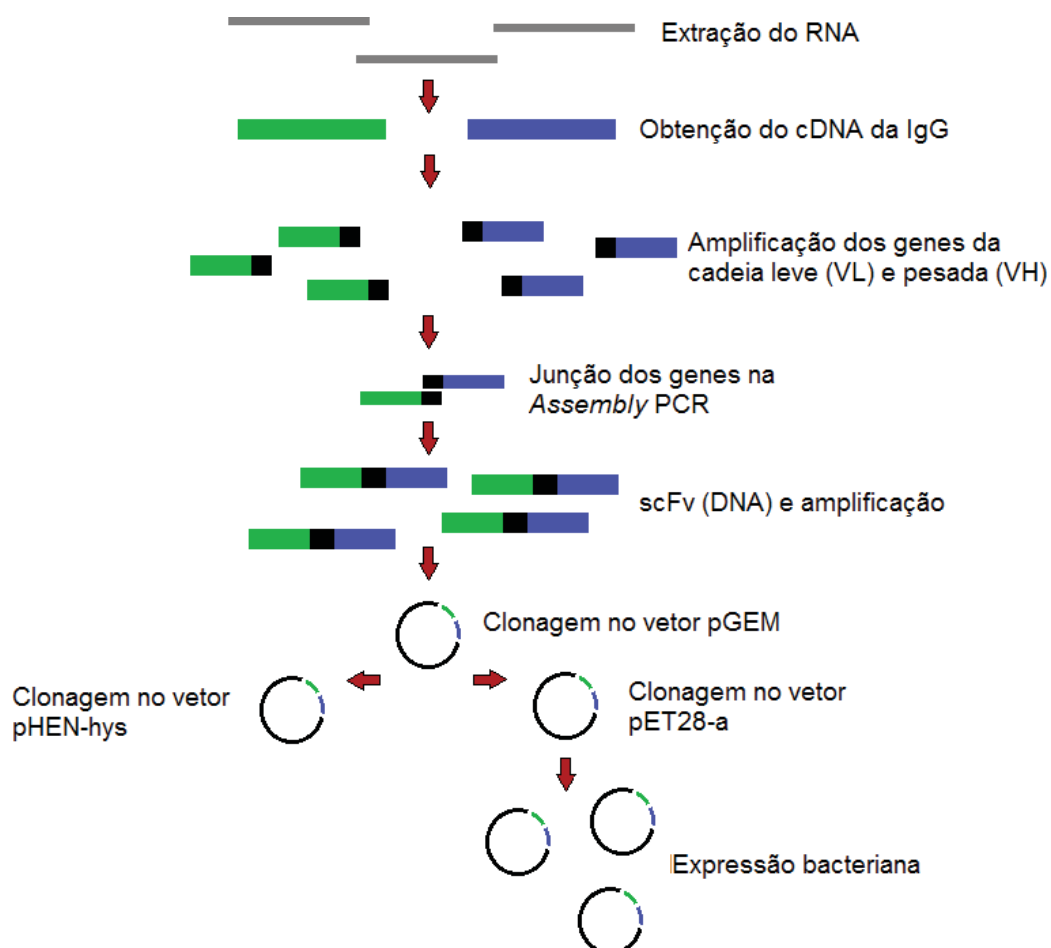


Figura 5: Esquema ilustrativo das etapas de construção do anticorpo de cadeia única.

A segunda reação foi uma PCR de união realizada na ausência de iniciadores. Nesta, genes das cadeias variáveis leve e pesada foram unidas

usando 1/10 do produto da Reação 1 como molde; e 20 ciclagens de 94°C por 1 minuto, 63°C por 1 minuto e 68°C por 1 minuto foram feitas. Finalmente, a terceira reação padrão de amplificação foi realizada utilizando os iniciadores Y15 e Y18 (Tabela 4) a 25 pmol com o objetivo de alongamento do DNA e inserção de sítios de restrição.

TABELA 4: INICIADORES USADOS PARA AMPLIFICAÇÃO DO PRODUTO DA ASSEMBLY PCR.

Iniciador	Sequências
Y15	5'-gcc aag ctt tgg agc ctt ttt ttt gga gat ttt caa cgt gaa aaa att att att cgc aat tcc ttt agt tgt tcc ttt cta tgc ggc cca gcc ggc cat ggc c-3'
Y18	5'-ata ggc cat ggc gac ctg gcg cac ggc gta tct gac-3'

As amostras foram então purificadas do gel de agarose com o kit de purificação GeneJET™ Gel Extraction Kit (Fermentas), e a confirmação da união das cadeias foi feita por eletroforese em gel de agarose 1,5%.

TABELA 5: CONDIÇÕES DE UMA REAÇÃO PADRÃO DE AMPLIFICAÇÃO POR PCR.

Reagentes	Quantidade
cDNA (produto da reação de RT-PCR)	5 ul
dNTP(20mM)	0,5 ul
iniciador 5'	25 pmol
iniciador 3'	25 pmol
Tampão 10x Taq Invitrogen™	5 ul
MgCl ₂ (50mM)	1,25 ul
Taq Invitrogen™	0,5 ul
Água DEPC	quantidade para 50 ul

3.5 Clonagem em pGEM

O vetor pGEM® T-Easy (Figura 6) foi escolhido como vetor de clonagem por possuir uma timidina não pareada na extremidade 5', permitindo a ligação de sequências que se iniciem com a adenina. A ligação foi realizada a 16 °C por 16 horas, usando a enzima T4 DNA ligase (Promega) e aproximadamente

150 ng de scFv e 50 ng de pGEM em uma reação de volume total de 10 µl. O produto da ligação foi adicionado a 100 µL de células *Escherichia coli* XL1-Blue (Stratagene™) quimiocompetentes e deixado em gelo por 30 minutos. Em seguida, as células foram deixadas por dois minutos em banho maria a 42°C, novamente em gelo por 3 minutos, e então plaqueadas em meio 2-XTY sólido (preparado com 16g de peptona, 10 g de extrato de levedura e 5 g de cloreto de sódio q. s. p. 1 litro em pH 7,4) adicionado de ampicilina (100 µg/mL) e tetraciclina (100 µg/mL). As placas de cultura foram crescidas por 16 h a 37°C. Para a preparação das células quimiocompetentes, células *E. coli* XL1 Blue foram crescidas em 200 mL de meio 2-XTY. A cultura bacteriana foi centrifugada por 10 minutos a 3.000 x g, o *pellet* foi lavado em cloreto de magnésio 100 mM, resuspenso em solução de cloreto de cálcio 100 mM e deixado em gelo por 30 minutos. O material foi novamente centrifugado durante 10 minutos e armazenado a -70°C em cloreto de cálcio 100 mM glicerol 2%.

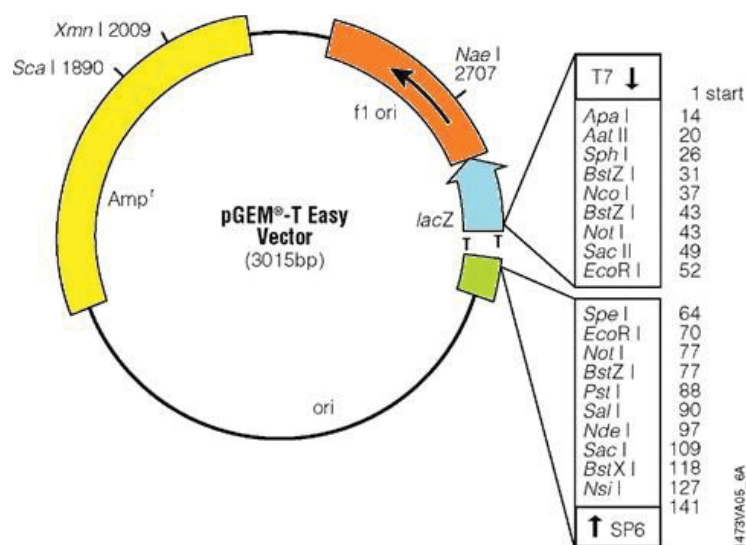


Figura 6: Mapa do vetor pGEM T-easy mostrando o sítio de inserção da proteína recombinante e os sítios de restrição das enzimas *NotI* e *NcoI*.

3.6 Amplificação do scFv pelo vetor pGEM

Após a transformação, foi realizada uma PCR de colônia usando os iniciadores VL5'2 e VH3'1, e dentre os clones considerados positivos, foi feita a

extração plasmidial. Na extração, 10 ml de cultura bacteriana foram centrifugados a 10.000 x g (2 minutos), o *pellet* foi adicionado à solução GET (50 mM Glucose, 25 mM Tris-Cl, 10 mM EDTA, pH 8), homogeneizado e adicionado à solução de lise (0.2 M NaOH, 1% SDS). O produto foi deixado em gelo por 10 minutos e em seguida, foi adicionada à mistura acetato de potássio 5M (pH 4,8), centrifugada a 10.000 x g (30 minutos), e teve seu sobrenadante recuperado para posterior precipitação com isopropanol e adição de RNase. O produto da extração plasmidial foi usado tanto para a realização do sequenciamento de DNA como para a restrição com as enzimas *NotI* e *NcoI* e futura clonagem no vetores pHEN-his e pET28-a.

3.7 Sequenciamento

Para o sequenciamento do DNA do vetores pGEM-scFv, pHEN-his-scFv e pET28-a-scFv foram utilizados, em reações separadas, os iniciadores evidenciados na Tabela 6. Às reações de aproximadamente 50 ng dos plasmídeos, foi adicionado 1 uL de *Big Dye® Terminator*, 2 uL de *Big Dye® Sequencing Buffer* e os respectivos iniciadores a 10 pmol. As reações foram precipitadas com isopropanol 75%, lavadas em etanol 70%, secadas por 2 horas a 37°C e resuspensas em formamida. Antes da aplicação no sequenciador ABI 313 (Avant), as amostras passaram por um choque térmico de 96°C e 0° por 5 minutos.

TABELA 6: SEQUÊNCIAS DOS INICIADORES M13 F, M13 R, PHEN R E PHEN F USADOS NO SEQUENCIAMENTO DOS PLASMÍDEOS PGEM-SCFV E PHEN-HIS-SCFV.

Iniciador	Sequências
M13 F	5'- gtt ttc cca gtc acg ac-3'
M13 R	5'-cag gaa aça gct atg ac-3'
pHEN F	5'-tga tta cgc caa gct tgc-3'
pHEN R	5'-ttg tcg tct ttc caga cg-3'
T7	5'-taa-tac-gac-tca-cta-tag-gg-3'
T7 Terminator	5'-cta-gtt-att-gct-cag-cgg-tg-3'

3.8 Análise do sequenciamento

O sequenciamento de DNA foi analisado com uso das ferramentas Translate (disponível no site <<http://www.expasy.ch/tools/>>), Blastx (disponível no site <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>>), IMGT/V-QUEST (GIUDICELLI e LEFRANC, 1999) e o software Serial Cloner 2.1 para a obtenção da sequência deduzida de aminoácidos; comparação com demais sequências murinas em banco de dados público; identificação da estrutura 2D e identificação de regiões determinantes de complementariedade, respectivamente.

3.9 Clonagem nos vetores de expressão

Os vetores pHEN-his (Figura 7) e pET28-a (Figura 8) foram purificados e digeridos separadamente com 20 unidades da enzima *Nco*I (Fermentas®) para cada 1 ug de DNA. Em seguida foi feita a digestão com a enzima *Not*I (New England Biolabs®), utilizando 10 Unidades de *Not*I para cada 1 ug de DNA. O mesmo procedimento de digestão foi realizado com o plasmídeo pGEM-scFv.

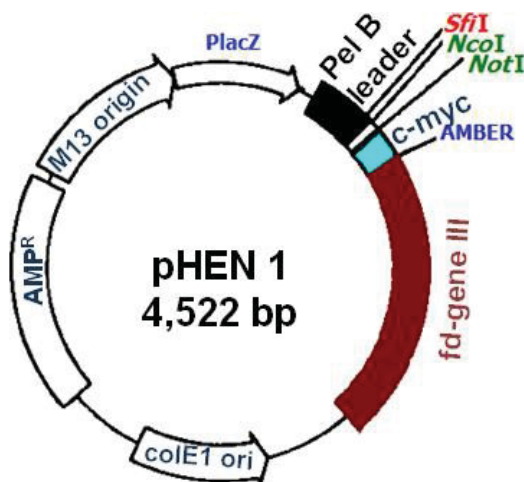


Figura 7: Mapa do vetor pHEN 1, diferenciado do vetor pHEN-his apenas pela região c-myc tag, correspondente à cauda de 6 histidinas no vetor pHEN-his. O esquema evidencia os sítios de reconhecimento das enzimas de restrição *Nco*I e *Not*I que foram usados para a ligação. (HOOGENBOON *et al*, 1991).

As amostras (aproximadamente 150 ng de scFv e 50 ng de pHEN-his e pET28-a) foram ligadas e transformadas em cepas BL21 Star™ (DE3) e XL1-Blue de *E. coli* através de quimiotransformação.

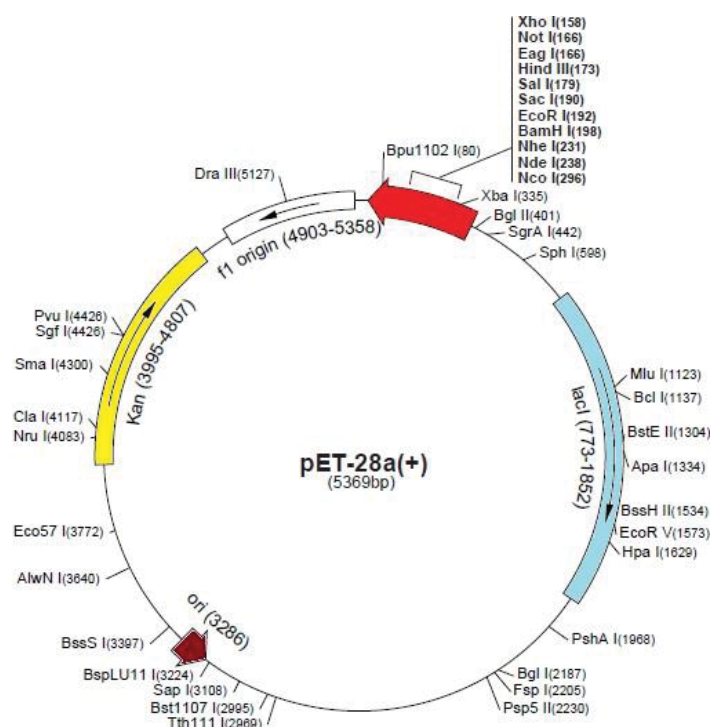


Figura 8: Mapa do vetor pET28-a evidenciando a localização dos sítios de restrição das enzimas *NotI* e *NcoI*.

3.10 Expressão

Os testes para escolha da condição de expressão foram feitos a partir do cultivo de células BL21(DE3) não transformadas e células BL21(DE3) contendo ou o plasmídeo pET28-a-scFv ou pHEN-his-scFv. Para tanto, colônias positivas isoladas foram adicionadas a 10 ml de meio 2-XTY por 16 horas e deixadas sob constante agitação a 37°C (pré-inóculo). Um mililitro desse cultivo foi somado a 14 ml de meio 2-XTY e crescido até a absorbância 0,6 em 600 nm. Nesse ponto, diferentes tempos de crescimento e concentrações de IPTG foram testados para cada amostra: IPTG 0,5 mM; 0,7 mM; e 1,0 mM em tempos de 0h, 3h e 5h.

Todas as amostras das diferentes condições de cultivo passaram por centrifugação a 10.000 x g 5 minutos, foram ressuspensas em tampão STE (NaCl 100 mM; Tris-Cl 10 mM, pH 8.0; EDTA 1 mM) e sonicadas em 3 ciclos de 15 segundos em potência 30% antes da avaliação em SDS-PAGE 12,5%.

Após a sonicação, testes de solubilidade foram feitos com o produto total de expressão bacteriana em diferentes concentrações de ureia (2M, 4M, 6M e

8M) em tampão fosfato (Fosfato de sódio 20 mM Cloreto de sódio 0.5 M) e verificados em SDS-PAGE 12,5%.

Para expressão em maior escala, três mililitros do pré-inóculo foram acrescentados a 300 ml de 2-XTY e deixado a 25°C em agitação. A adição do IPTG 0,7mM foi feita em absorbância de 0,6 e o crescimento foi interrompido após 5 h da adição. O material também foi centrifugado (4.000 x g 15 minutos), o *pellet* foi resuspendido em 25 mL de tampão STE e então sonicado segundo as condições já descritas.

3.11 Purificação

Após a sonicação, 3,5 mL de STE contendo o produto da expressão foi centrifugado (10.000 x g 5 minutos), e o *pellet* formado foi resuspenso em fosfato de sódio 20 mM cloreto de sódio 0,5 M com adição de ureia 8M e imidazol 30 mM. Esse material foi homogeneizado com pipeta, agitado vigorosamente e foi repetidamente transferido para seringa com agulha de 13 x 0,45 mm. Uma nova centrifugação (10.000 x g 15 minutos) foi feita, e o sobrenadante foi submetido a uma etapa de purificação manual utilizando uma coluna de níquel *Ni Sepharose High Performance* (GE Healthcare™), pelo princípio de imunoafinidade com a cauda de histidina. Após a aplicação do material na coluna, em um fluxo aproximado de a 1 mL/minuto, a resina foi lavada com 20 mL de tampão fosfato com imidazol 40mM. A melhor condição de eluição da proteína scFvLimAb7 foi verificada a partir de um gradiente de concentração de imidazol, 750 uL para as condições de 100mM, 200mM, 300mM, 400mM e 2,5 mL na concentração de 500mM. Para cada concentração de imidazol, foram coletadas 3 ou mais alíquotas de 250 uL, segundo recomendações feitas pelo fabricante.

3.12 Eletroforese e Coloração dos géis

Géis de acrilamida foram preparados com aproximadamente 15 mL da solução de gel de separação 12,5% (Tabela 7) e aproximadamente 2 mL da solução do gel de concentração 4 %. Após polimerização, os géis foram

deixados em corrente de 100 V em eletroforese até a separação das proteínas. Em seguida, foram corados em solução de Azul de Coomassie Brilhante 0,25% metanol 45% e ácido acético glacial 9% por 30 minutos sob agitação constante, e então descorados em sucessivas lavagens de etanol 4,5% e ácido acético glacial 9%.

TABELA 7: CONSTITUIÇÃO DOS GÉIS DE SEPARAÇÃO E CONCENTRAÇÃO USADOS NA ELETROFORESE.

	Gel de Separação	Gel de Concentração
Acrilamida 30% Bisacrilamida 0,8%	8,34 mL	1,3 mL
Tampão Tris-HCl 1,5M, pH 8,8	5 mL	2,5 mL
Sulfato Sódico Dodecila (SDS) 10%	200 uL	100 uL
Água deionizada	6,32 mL	6,1 mL
Persulfato de amônio (PSA)	140 uL	7 uL
N,N,N',N'-tetrametilenodiamino (TEMED)	14 uL	14 uL

A coloração de géis por nitrato de prata foi inicialmente feita com lavagens em água destilada seguida de adição em solução de metanol 50%. Duas novas lavagens em água (de 5 minutos) foram feitas até a submersão em solução de glutaraldeído 10% por 20 minutos. O gel foi deixado novamente em água destilada, com quatro trocas a cada 5 minutos e então adicionado em solução de prata. Esta foi preparada com 10 mL de Nitrato de prata 5% lentamente adicionado a 26,5 mL de solução de Hidróxido de sódio 0,36% e 1,5 mL de Hidróxido de amônio acrescentado de 12 mL de água destilada. Duas novas passagens em água foram feitas até a revelação dos géis em solução de Formaldeído 0,1% e ácido acético glacial 0,025%. Após aparecimento das bandas, a reação foi interrompida em solução de ácido acético glacial 1% por 20 minutos, os géis foram armazenados em etanol 25% glicerol 1,5% e então fotografados.

3.13 Western Blot

Ensaio de *Western Blot* foram realizados para verificar o

reconhecimento da proteína scFvLimAb7 frente ao veneno bruto de *Loxosceles intermedia*. Quarenta microlitros do produto de expressão bacteriana de células BL21 não transformadas e células BL21 expressando o scFvLimAb7 foram submetidos a eletroforese SDS-PAGE 12,5%. Ao final do processo de separação, o gel foi transferido para uma membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF) previamente ativada por 30 segundos em metanol. A transferência foi feita a 24 V por 16 horas e três lavagens de 5 minutos com PBS tween 0,05% caseína 0,5% foram feitas antes e após cada incubação. A etapa de bloqueio foi feita com PBS tween 0,3% caseína 5% por uma hora à temperatura ambiente, e a etapa de incubação foi feita com o veneno bruto de *L. intermedia* (a 20 µg/mL) por uma hora na temperatura de 37°C. Diluições de 1:500 para o anticorpo “anti-veneno de *L. intermedia* conjugado a peroxidase” (anti-Li, gentilmente cedido pelo professor Carlos Chaves Olórtgui da Universidade Federal de Minas Gerais) e de 1:10.000 para o anticorpo “anti-histidina conjugado a peroxidase” (Anti-his, Roche Applied Science) foram utilizadas. As incubações com os anticorpos secundários também tiveram uma hora de duração e todas as etapas foram feitas sob agitação constante. Por fim, as membranas foram reveladas com o Amersham™ ECL™ Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare).

3.14 ELISA

O ensaio de ELISA foi iniciado com a imobilização de amostras purificadas da proteína scFvLimAb7 (0,4 e 1 µg/poço) e do anticorpo LimAb7 (1 µg/poço) em placas de microtitulação de 96 poços (Falcon – Beton Dickson). Nessa etapa, as proteínas foram suspensas em tampão bicarbonato de sódio 0,05 M pH 9,6 e deixadas a 4°C por 16 horas.

O bloqueio foi feito com PBS-caseína 2% por uma hora a 37°C, e para a primeira etapa de incubação, foi adicionado 0,5 µg/poço do veneno bruto de *Loxosceles intermedia* (gentilmente cedido pelo professor João Carlos Minozzo do Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos - CPPI) em tampão de incubação (PBS-caseína 0,25%, Tween 20 0,05%) nas mesmas condições. Os anticorpos conjugados a peroxidase anti-Li e anti-his foram diluídos

respectivamente nas concentrações de 1:500 e 1:10.000 em PBS-caseína 0,25%, Tween 20 0,05%, e também foram incubados a 37°C por uma hora.

Para a revelação, foi utilizada solução de tampão citrato pH 5,0, peróxido de hidrogênio e cromógeno ortofenilenodiamina (OPD) por 15 minutos e a reação foi interrompida com a adição de 20 µL/poço de H₂SO₄ (5%). A reação foi analisada em um leitor de ELISA Bio Rad 550 e a absorbância foi lida em comprimento de onda de 490 nm. É importante ressaltar que todos os ensaios foram feitos em duplicata e entre cada etapa de incubação, foram feitas três lavagens sucessivas em solução de PBS-Tween 20 0,05%.

4. RESULTADOS

Os primeiros resultados obtidos correspondem ao produto de amplificação da reação de transcriptase reversa (RT-PCR). Nesses, foram observadas reações positivas apenas quando usados os iniciadores RT1, RT3 e RT4, indicando que provavelmente, os isotipos dos anticorpos LimAb7 e do scFvLimAb7 correspondem à cadeia leve κ (kappa) e à cadeia γ (gamma) 1 ou 2a. Dentre as diferentes combinações (OKAMOTO *et al*, 2004) de iniciadores degenerados testados, foram selecionados os iniciadores com melhor amplificação dos DNAs das cadeias variáveis, sendo eles: VL5'2, VL3'1, VH5'2 e VH3'1.

A amplificação do DNA das cadeias variáveis leve e pesada foi confirmada por eletroforese em gel de agarose 1,5% (Figura 9), evidenciando bandas próximas a 400 pb após a amplificação com os iniciadores VL5'2 e VL3'1 para cadeia leve, e VH5'2 e VH3'1 para a cadeia pesada.

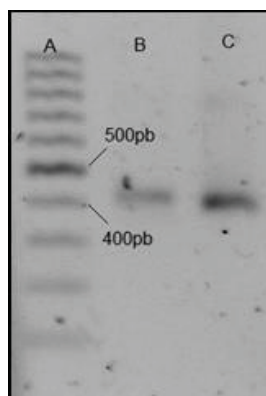


Figura 9: Perfil de amplificação das cadeias leve e pesada. A: Padrão de peso molecular; B: Produto de PCR da cadeia variável pesada (VH); e C: Produto de PCR da cadeia variável leve (VL).

A obtenção da sequência codificante do scFv após a *assembly* PCR também foi verificada através de eletroforese, em gel de agarose 1,5%. A sequência do scFv apresentou um tamanho de aproximadamente 900 pares de bases, corroborando com a soma das sequências das cadeias leve e pesada (Figura 10).

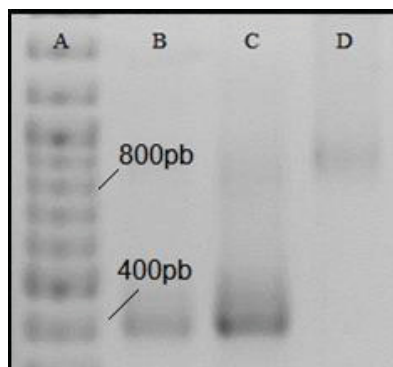


Figura 10: Montagem do scFv na *assembly* PCR. Gel de agarose 1,5% mostrando em A: Padrão de peso molecular; B: Cadeia variável pesada; C: Cadeia variável leve; e D: Fragmento de scFv.

A eficiência de ligação ao vetor pGEM foi verificada através de PCR de colônia usando os iniciadores VL5'2 e VH3'1 e reações foram consideradas positivas quando evidenciavam bandas de aproximadamente 800 pb em eletroforese (Figura 11).

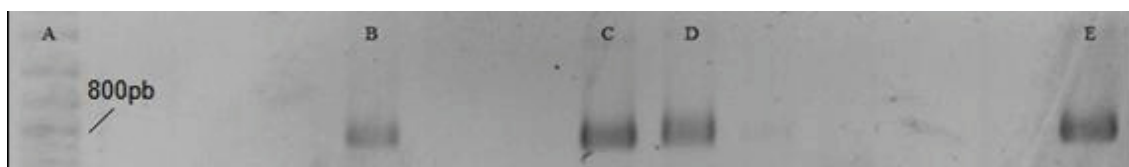


Figura 11: Gel de agarose 1,5% evidenciando clones positivos ao inserto (scFv) nas letras B, C, D e E..

A fim de confirmar a inserção do scFv em pGEM e estimar sua sequência polipeptídica, foi realizado o sequenciamento de DNA (Figura 12) e a pesquisa de homologia em banco de dados público (GENBANK, acessado no site <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>>, 2013), através do programa Blastx (Figura 13). Esses dados confirmaram tanto a construção correta esperada do scFv como a homologia entre o scFvLimAb7 e demais sequências polipeptídicas de anticorpos de cadeia única murinos.

```

CCATGGGcgatatatttgatgatgcagtcctccatccctcctggctgtgacagcaggagagaaggtcactatg
M A D I L M M Q S P S S L A V T A G E K V T M
agatgcaagtcagtcagagtcctttgtggaatgtaataaaaaaactacttatcctggtagcagcagaa
R C K S S Q S L L W N V N E N N Y L S W Y Q Q K
acaagggcagcctcctaaactgcttatctatggggcatccattagagaatcctgggtccctgatcgattca
Q G Q P P K L L I Y G A S I R E S W V P D R F
caggaagtggatctgggacagacttcaatctcaccattagcaatgttcagctgaagacctagcagtttat
T G S G S G T D F N L T I S N V H A E D L A V Y
tactgtcagcacaatcatggcagctttctcccgtaacggttcggaggggggacaaagctggaaatcaaacg
Y C Q H N H G S F L P Y T F G G G T K L E I K R
gggtgggtggtagcggcgccggcggtctggtgggtggatccgaggtccaactgcaacagtcctggac
G G G G S G G G S G G G S E V Q L Q Q S G
ctgagctgggtgaagcttggggcctcagtgaaagatttctgcaaagcttctggctacgcattcagtagttct
P E L V K L G A S V K I S C K A S G Y A F S S S
tgatgaactgggtgaagcagagggccaggacagggctcttgagtgagtgacggatttatcctggagatgg
W M N W V K Q R P G Q G L E W I G R I Y P G D G
agatactaactacaatgggaagttcaaggccaaggccacactgactgcagacaaatcctccagcacagcct
D T N Y N G K F K G K A T L T A D K S S S T A
acatgcagctcagcagcctgacctctgtggactctcggtctatttctgtgcaaggtggacctacggttat
Y M Q L S S L T S V D S A V Y F C A R W T Y G Y
agtaaatattactatttgacgactggggccaaggcacccctgtcacagtcctctcagcggccgcaggtgc
S K Y Y Y F D D W G Q G T L V T V S S A A A G A
gccggtgcccggccactctcaccgtctctcaGCGGCGGC
P V P A T L T V S S A A

```

Figura 12: Sequência parcial de nucleotídeos e deduzida de aminoácidos do plasmídeo pGEM-scFv obtida com o programa Expasy (2013). Na sequência de nucleotídeos estão destacados em verde os sítios de *NcoI* e *NotI*, e na sequência deduzida de aminoácidos está destacado o peptídeo ligante que conecta a parte C-terminal da região variável da cadeia leve (k) à parte N-terminal da região variável da cadeia pesada.

```

>emb|CAD69001.1| anti-CD95 and anti-HMWG scFv antibody [synthetic construct]
Length=564
Score = 289 bits (740), Expect = 2e-76
Identities = 165/249 (67%), Positives = 197/249 (80%), Gaps = 6/249 (2%)

Query 369 SGGGSGGGGS EVQLQQSGPELVKLGASVKISCKASGYAFSSSWMNWVKQRPQGLEWIG 548
          SGGGSGGGGS+VQL QSG E+ K G+SVK+SCKASGY F+S WM WVKQ PGQGLEWIG
Sbjct 136 SGGGSGGGGS QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTSYWMQWVKQAPQGLEWIG 195

Query 549 RIYPGDDTNYNGKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSVDSAVYFCARWTYGYKYFYF 728
          I P D TNYN KFKGKATLT D S+STAYM+LSSL S D+AVY+CAR YS +YF
Sbjct 196 EIDPSDSYTNYNQKFKGKATLTVDSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCAR-NRDYSNNWYF 254

Query 729 DDWGQGLTV 755
          D WGQGLTV
Sbjct 255 DVWGQGLTV 263

```

Figura 13: Pesquisa de homologia em banco de dados utilizando o programa BlastX. Os valores de homologia obtidos nessa pesquisa foram: Identidade de 67% e similaridade de 80%. A linha "Query" corresponde a sequência parcial de aminoácidos deduzida do clone de scFv28a obtido nesse trabalho e "Sbjct" corresponde ao polipeptídeo do "bi-scFv" anti-CD95 e anti-HMWG (número de acesso CAD69001 ou AJ544530). Parte do peptídeo ligante está realçada em azul.

A estrutura proteica 2D da proteína scFvLimAb7 ainda foi estimada pelo programa IMGT/V-QUEST (Figura 14) e a identificação de regiões de CDR foi

feita com o uso do software Serial Cloner 2.1 (Figura 15).

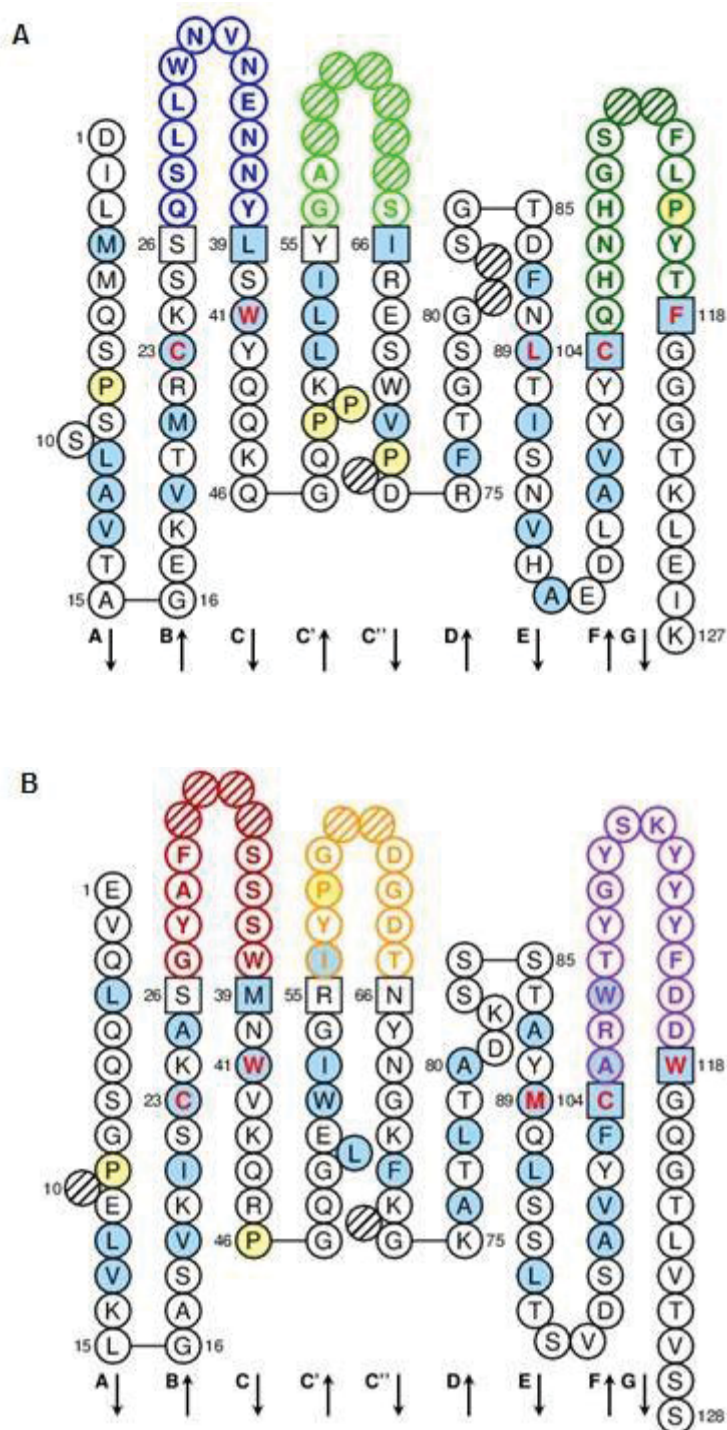


Figura 14: Representação gráfica 2D das cadeias variáveis leve (A) e pesada (B) em formato “Colar de pérolas” obtida pelo programa IMG2/V-QUEST, 2013. Regiões de CRD estão delimitadas entre aminoácidos em quadrados. Pérolas destacadas com listras representam aminoácidos não correspondentes no banco de dados IMG2 e aminoácidos hidrofóbicos estão representados em círculos preenchidos pela cor azul.

Noot

CDR1
 cc atg acc gat att ttg atg atg cag tct cca tcc tcc ctg gct ttg aca gga gag aag gtc act atg aga tgc aag tcc agt cag agt ctt ttg tg < 100
 M A D I L M N Q S P S L A V I A G E K V I M R C S O S L L W
 gg tac cgg cta taa aac tac tac gtc aga ggt agd gag cag cag tgt cgt cct ctg ttc cag tga tgc tct acg ttg agt tca gtc tca gaa aac ac
 10 20 30 40 50 60 70 80 90

CDR2
 g aat gtt aat gaa aat aac tac tta tcc tgg tac cag cag aca ggg cag cct cct aaa ctg ctt atc tat ggg gaa tct ttg gtc < 200
 N V N E N N Y L S W Y Q Q K Q G P K L L I Y G A S I R E S W V
 c tta caa tta ctt tta ttg atg aat agd acc atg gtc ttg gtc ccc gtc gga gaa ttt gac gaa tag ata ccc cgt agt taa tct ctt aga acc cag
 110 120 130 140 150 160 170 180 190

CDR3
 cct gat cga ttc aca gga agt gga tct ggg aca gac ttc aat ctg acc att agc aat gtt cat gct gaa gac cta gaa gtt tat tac tgt cag cac aat c < 300
 P D R F I G S G I D F N L I S N V H A E D L A V Y Y C Q H N H
 gga cta gct aag tgt cct tca cct aga ccc tgt ctg aag tta gag tgg taa tgg tta cga ctt ctg gat cgt cca ata atg aca gtc gtg tta g
 210 220 230 240 250 260 270 280 290

at ggc agc ttt ctg ccc tac aag ttg gga ggg ggg acc aag ctg gaa atc aaa cgg ggt ggt ggt ggc ggc ggc tct ggt ggt ggt gga tc < 400
 G S P L P Y I F G G I K L E I K R G G G S G G G S G G S G G G S
 ta cgg tgg aaa gag ggc atg tgc ggt cct ccc ccc tgg ttc gac ctt tag ttt gcc cca cca cca tgg cgg cgg cgg aga cca cca cca cct ag
 310 320 330 340 350 360 370 380 390

CDR1
 c gag gtc cga ctg cga cag tct gga cct gag ctg gtt agd ctt ggg ggc tca gtt aag att tcc tgc aaa gct tct ggc tac gaa ttc agt agt tct tgg < 500
 E V Q L Q Q S G P E L V K L G A S V K I S C K A S G Y A F S S S W
 g ctg cag gtt gac gtt ctg aga cct gga ctg gac cac ttc gaa ccc cgg agt cac ttc taa agd agt ttt cga aga cgg atg agt agt tca tca aga acc
 410 420 430 440 450 460 470 480 490

CDR2
 atg aac tgg gtt aag cag agd cca gga cag ggt ctt gag tgg att gga cgg att tat cct gga gat gga gat act aac tac aat ggg aag ttc aag ggc a < 600
 M N W V K Q R P G Q G L E W I G R
 tac tgg acc cag ttc gtc tcc ggt cct gtc cca gaa ctg acc taa cct gcc taa ata gga cct cta cta cta tga tgg atg tta ccc ttc aag ttc cgg t
 510 520 530 540 550 560 570 580 590

ag ggc aca ctg act gca gac aca tcc tcc agc aca ggc tac atg cag ctg agc agd ctg agt tct ggt gac tct gag gtc tat ttc tgt gca agd tgg ag < 700
 A I L I A D K S S I A Y M Q L S S L I S V D S A V Y F C A R W I
 tc cgg tgt gac tga cgt ctg ttt atg agd agd agd tgg tgt cgg atg tac gtc gag tgg tgg gac tgg aga cac ctg aga cgc cag ata aag aca ggt tcc acc tgg
 610 620 630 640 650 660 670 680 690

CDR3
 c tac ggt tat agt aca tat tac tac ttt gac gac tgg ggc cca ggc acc ctt gtc aca gtc tct tca ggc ggc gaa caa aca ctg atc tca gaa gag < 800
 Y G Y S K Y Y Y F D D W G O G I L V I V S S A A A E O K L I S E E
 g atg cca ata tca ttt ata atg atg aca ctg agc cgg gtt cgg tgg gaa cag tat cgg aga ggt cgc cgg ggt ctt gtt ttg gag tag agt ctt ctg
 710 720 730 740 750 760 770 780 790

gat cga aat ggg gcc gta cat cac cag cat cac cat tag
 D R N G A V H H H H H *
 cta gct tta ccc cgg cat gta gtt gta gta atc
 810 820 830

Figura 15: Sequência nucleotídica e aminoacídica deduzida da proteína scFvLimAb7, evidenciando a localização de regiões de framework (FR) e de CDR.

Uma vez confirmada a identidade do produto clonado em pGEM, o passo seguinte foi a transferência do inserto para os vetores pHEN-his e pET28-a para avaliar a expressão da proteína na forma solúvel. Para essas novas reações, os plasmídeos pGEM-scFv, pHEN-his e pET28-a foram digeridos pelas enzimas *NcoI* e *NotI* (Figura 16), purificados, e usados na ligação.

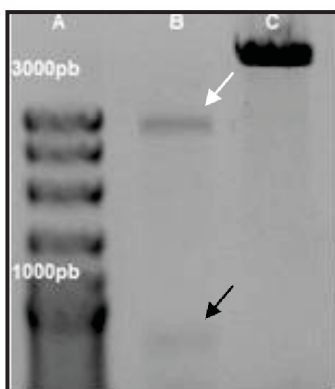


Figura 16: Perfil de digestão dos plasmídios pGEM-scFv e pHEN-his. Gel de agarose a 1% mostrando em A: Padrão de peso molecular; B: parte do material genético do vetor pGEM (seta branca) liberando a sequência do scFv (seta preta); e em C: o vetor pHEN-his após o corte com as enzimas *NcoI* e *NotI*.

Colônias BL21 positivas para os plasmídeos pET28-a-scFv e pHEN-his-scFv foram usadas no protocolo de expressão previamente descrito no item 3.10. Em gel de acrilamida 12,5%, não foi observada alta expressão com o vetor pHEN-his-scFv, mesmo após tratamento em tampão de ureia 8M (dados não mostrados). Já a análise do extrato bruto da expressão bacteriana de células contendo o plasmídeo pET28-a-scFv mostrou em gel de acrilamida 12,5% a presença de uma banda proteica de aproximadamente 32kDa, não observada em células não transformadas (Figura 17).

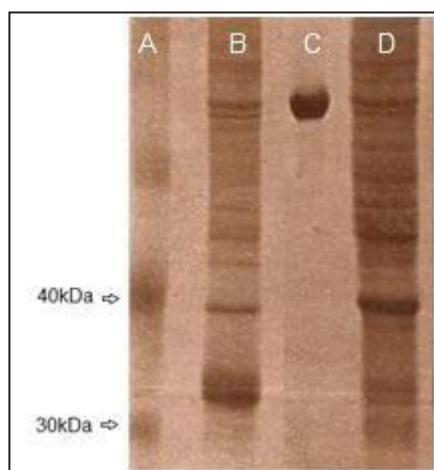


Figura 17: SDS-PAGE 12,5% corado por azul brilhante de coomassie, evidenciando em A: Padrão de peso molecular; B: produto da expressão de células BL21 contendo o vetor pET28-a-scFv; C: Albumina bovina; D: produto da expressão de células BL21 não transformadas.

A otimização da expressão do clone pET28-a-scFv foi feita com a variação das condições de expressão utilizadas, como sua duração e quantidade de IPTG adicionado (Figura 18), de modo que as condições IPTG 0,7 mM e tempo 5h foram as escolhidas para os experimentos seguintes.

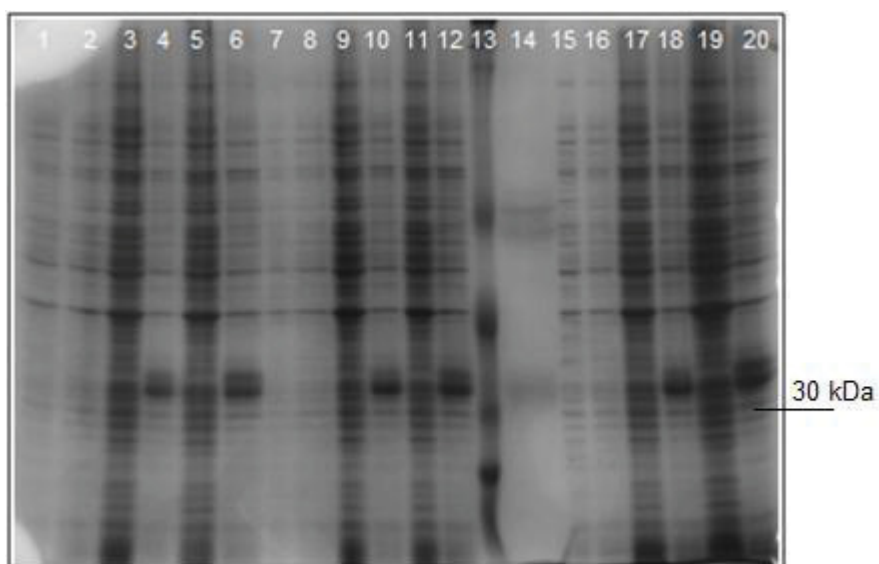


Figura 18: Gel de acrilamida 12,5% corado por coomassie mostrando em canaletas ímpares: células BL21 não transformadas; e pares: células BL21 contendo o vetor pET28-a-scFv. Canaletas 1, 2, 7, 8, 15 e 16 com 0 h de expressão; 3, 4, 9, 10, 17 e 18 com 3 h de expressão e 5, 6, 11, 12, 19 e 20 com 5 h de expressão. Canaletas de 1 a 6: com indução de 1mM de IPTG; 7 a 12: 0,7 mM de IPTG e; 15 a 20: 0,5 mM de IPTG. Canaleta 13: Padrão de peso molecular; 14: imunoglobulina G murina.

A expressão bacteriana da proteína scFvLimAb7 ainda foi testada quanto à solubilidade da molécula heteróloga produzida (Figura 19). Diferentes quantidades de ureia (2M, 4M, 6M e 8M) foram avaliadas para a solubilização do anticorpo, e dentre estas, o melhor resultado foi apresentado com ureia 8M, sendo esta a condição usada nos seguintes ensaios.

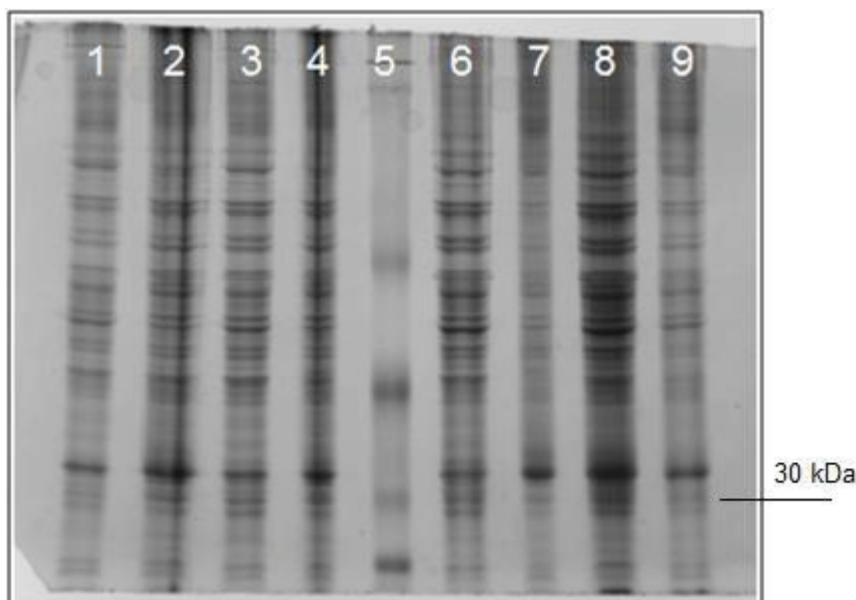


Figura 19: SDS-PAGE 12,5% com coloração feita por azul de coomassie. Diferentes concentrações de ureia foram testadas para a solubilização do scFvLimAb7. Canaletas 1, 3, 6, e 8 mostram as partes solúveis do produto da expressão bacteriana resuspenso em tampão com ureia, enquanto 2, 4, 7 e 9 são partes não solúveis ("pelletizadas" após centrifugação). Nas canaletas 1 e 2: ureia 2M; 3 e 4: ureia 4M; 6 e 7: ureia 6M e; 8 e 9: ureia 8M. Canaleta 5: Padrão de peso molecular.

Tentativas de purificação também foram realizadas em coluna de níquel, como evidenciado na figura 20. Condições de 100 mM, 200 mM, 300 mM, 400 mM e 500 mM de imidazol foram utilizadas para a eluição do anticorpo da coluna de afinidade, de modo que a condição de 500 mM revelou-se a mais indicada para a separação de proteínas bacterianas do anticorpo de interesse.

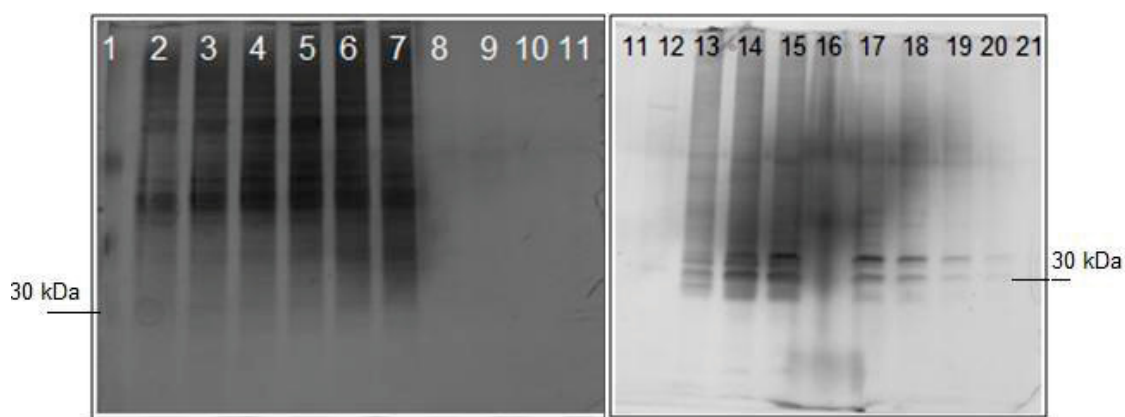


Figura 20: SDS-PAGE 12,5% com coloração por nitrato de prata, evidenciando nas canaletas 1 e 16: Padrão de peso molecular; 2 e 3: Eluição com imidazol 100mM; 4 e 5: imidazol 200mM; 6 e 7: imidazol 300mM; 8 e 9: imidazol 400mM; 10 a 16 e 18 a 21: eluição com imidazol 500 mM.

Ensaio de *Western Blot* mostraram que o anticorpo anti-his conjugado a peroxidase reconheceu especificamente a proteína expressa pelo clone pET28-a-scFv dentre as demais proteínas bacterianas expressas devido à sequência peptídica de histidinas na região N-terminal, confirmando a construção correta do anticorpo (Figura 21).

Também foi possível observar, em ensaios realizados entre o produto da expressão bacteriana e o veneno bruto de *L.intermedia*, o destaque de uma banda proteica (seta vermelha, figura 21) de aproximadamente 32 kDa em relação às demais proteínas. Essa característica reforça a hipótese de reatividade entre a proteína scFvLimAb7 e o veneno da aranha *Loxosceles intermedia*.

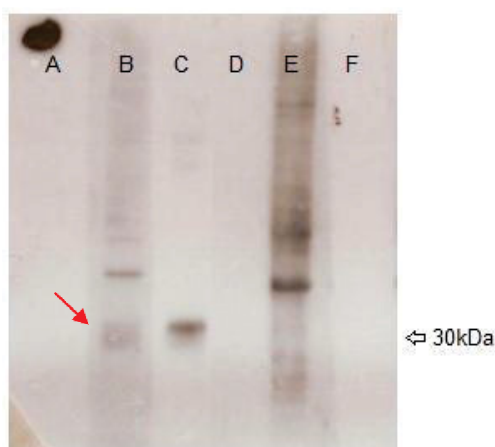


Figura 21: Ensaio de *Western Blot* com revelação por ECL, mostrando membranas de PVDF transferidas com o produto da expressão bacteriana contendo o clone pET28-a-scFv (A, B e C) e o produto da expressão bacteriana de células não transformadas (D, E e F). Em A e D:

membranas foram tratadas somente com o anticorpo anti-Li; B e E: membranas incubadas com o veneno bruto de *L. intermedia* e o conjugado anti-Li; e em C e F: incubação somente com o anticorpo anti-his.

A caracterização do scfvLimAb7 também foi realizada por ELISA (Gráfico 1), no qual, as proteínas recombinantes purificadas foram testadas nas concentrações 0,4 µg/poço e 1 µg/poço frente ao veneno bruto de *L. intermedia*. O resultado apresentado confirmou tanto a reatividade da proteína recombinante frente ao veneno como mostrou uma relação dose dependente entre a concentração de scFvLimAb7 e a absorbância obtida. Ensaios de ELISA também foram feitos em formato indireto, utilizando o anticorpo anti-his para o reconhecimento de LimAb7, apresentando resultados similares ao gráfico 1 (Dados não mostrados).

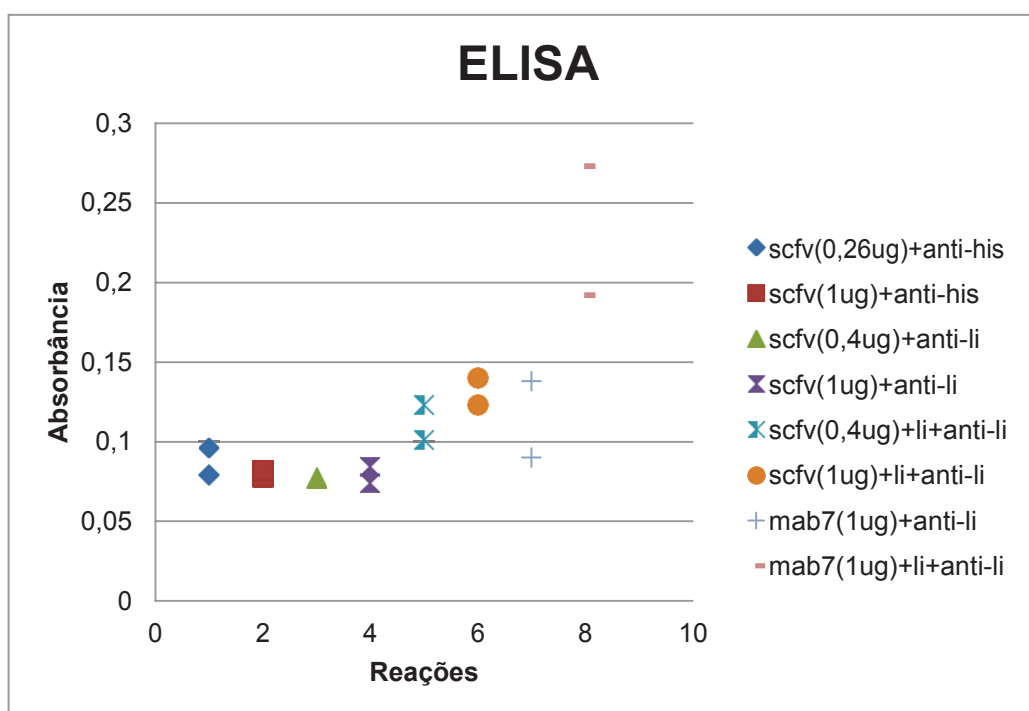


Gráfico 1: Reatividade da proteína recombinante scFvLimAb7 (em concentrações de 0,4 e 1 µg/poço) ao veneno bruto de *Loxosceles intermedia* (1 µg/poço) e ao anticorpo conjugado à peroxidase anti-his.

5. DISCUSSÃO

Nos últimos anos, acidentes loxoscélicos representam uma grande parte dos agravos de notificação relatados pelo SINAN (2012), especialmente na região sul do país e no estado do Paraná. Dentre os tratamentos propostos, é preconizado pelo Ministério da Saúde (2001) e pelo Centro de Produção e Pesquisas de Imunobiológicos, a administração dos soros antiaracnídico e antiloxoscélico, este último, produzido a partir da imunização de cavalos com os venenos de *Loxosceles laeta*, *L. gaucho* e *L. intermedia*. Por serem moléculas heterólogas, quando administrados, esses anticorpos podem induzir reações de hipersensibilidade em 6,5 a 20% dos casos (PAULI *et al*, 2006). Portanto, aprimoramentos no uso de antivenenos e na diminuição desses efeitos têm sido estudadas por vários grupos (THEAKSTON *et al*, 2003; e ESPINO-SOLIS *et al*, 2009).

Como o tamanho do anticorpo administrado e a presença da região Fc são fatores consideráveis para o reconhecimento do soro pelo sistema imune do paciente, e conseqüentemente para o desencadeamento de reações alérgicas, o soro antiloxoscélico é composto apenas por fragmentos F(ab')₂. Esses fragmentos, apesar de não possuírem a região Fc e serem menos imunogênicos que um anticorpo inteiro, possuem dois domínios idênticos compostos pelas regiões variáveis e região constante do anticorpo original (THEAKSTON *et al*, 2003).

Sendo assim, novas linhas de pesquisa para a geração de antitoxinas e antivenenos baseiam-se na produção de anticorpos recombinantes ou anticorpos de cadeia única (também chamados scFvs). Esses fragmentos são constituídos apenas dos domínios variáveis do anticorpo original, e quando construídos a partir de hibridomas secretores de anticorpos monoclonais, podem manter as características de alta especificidade ao antígeno, rápida *clearance*, rápida chegada ao tecido alvo (OLAFSEN e WU, 2010) e acredita-se, alta capacidade de neutralização (JUSTE *et al*, 2006 e DEVAUX *et al*, 2001).

Segundo Dolezal *et al* (2000), a molécula de scFv é o menor fragmento capaz de manter a mesma atividade e especificidade de um anticorpo inteiro. No entanto, trabalhos como o de Wu *et al* (2012) e Olafsen e Wu (2010)

relacionam o pequeno tamanho desses anticorpos com seu curto tempo de retenção no tecido alvo *in vivo*. Outros autores, como Kazuma (2010), defendem que alternativas para esse problema podem ter sua base na modificação de características do ligante peptídico. Sabe-se que a composição do ligante desempenha um papel importante na estabilidade de scFv, assim como seu encurtamento pode favorecer a formação de oligômeros. A oligomerização do scFv, juntamente com a construção de anticorpos quiméricos ou biespecíficos, são as principais possibilidades exploradas para o aumento do seu tempo de permanência no tecido alvo (RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ *et al*, 2012; e RAAG e WITHLOW, 1995).

No que se refere à obtenção das sequências de RNA, o uso de iniciadores específicos para os isotipos de imunoglobulina G, desenhados a partir de sequências disponíveis no banco de dados Genbank, foi a estratégia empregada neste trabalho. Quando comparada ao uso de oligo(dTs), relatado pelo grupo de Okamoto *et al* (2004), esta mostrou-se uma escolha vantajosa por direcionar a amplificação nesta etapa de construção e evitar possíveis contaminações com demais RNAs celulares.

Para a obtenção das sequências de DNA das cadeias do scFv, tanto iniciadores específicos para amplificação dos domínios variáveis do anticorpo (MURAMATSU *et al*, 2005; TOLEIKIS e FRENZEL, 2012) como iniciadores degenerados (KOOHAPITAGTAM *et al*, 2010) podem ser empregados. A primeira alternativa permite maior fidelidade em relação à amplificação das sequências de CDR desconhecidas da imunoglobulina (CHARDÈS *et al*, 1999), enquanto é característico da amplificação com iniciadores degenerados a obtenção de mais de um tipo de sequência e maior cobertura do segmento esperado (SUN *et al*, 2012; e KOOHAPITAGTAM *et al*, 2010). Aqui, optou-se pela seleção (a partir da qualidade de amplificação) de uma única combinação dos iniciadores degenerados descritos por Okamoto *et al* (2004). Ainda, acredita-se que a diversidade de anelamentos ao DNA molde permitida por esses iniciadores possa ser a responsável por possíveis alterações no paratopo funcional de LimAb7 (SCHAEFER *et al*, 2010; TOLEIKIS e FRENZEL, 2012).

O sequenciamento de DNA realizado, além de confirmar a construção desse anticorpo, permitiu a comparação de similaridade entre o scFvLimAb7 e

anticorpos disponíveis no programa GenBank. A similaridade de 80% com outros anticorpos de cadeia única confirma a obtenção das regiões variáveis da imunoglobulina LimAb7 e a ausência de homologia total com demais fragmentos sugere a especificidade desse anticorpo. Também é importante ressaltar que o anticorpo scFvLimAb7 apresentou um tamanho padrão de construção, de aproximadamente 30 kDa, quando comparado a outros relatos na literatura (ZAHID *et al*, 2011).

Ofran *et al* (2008) comentam a importância da identificação de regiões de CDR de um anticorpo recombinante, já que sua composição aminoacídica e seu comprimento podem ser capazes de determinar o tipo de antígeno reconhecido pelo anticorpo e até auxiliar na identificação de um epítipo antigênico. A detecção dessas regiões na proteína scFvLimAb7, feita com o uso da plataforma IMGT (RUIZ e LEFRANC *et al*, 2002), pode representar um passo relevante na identificação de componentes do paratopo que interage com as partes mais imunogênicas das enzimas esfingomielinases D de *L. intermedia*, assim como confirmar informações importantes presentes na estrutura do scFv.

A escolha dos vetores pET28-a e pHEN-his neste trabalho deu-se principalmente pela bem relatada expressão e purificação de moléculas com cauda de histidina, pela facilidade de expressão no vetor pET28-a, e pela presença do gene fd-III no vetor pHEN-his, possibilitando a exteriorização do scFv no capsídeo de bacteriófagos em ensaios futuros (HOOGENBOOM *et al*, 1991). Os plasmídeos pHEN1 e seus derivados, como o vetor pHEN-his, são vetores comumente utilizados para a obtenção de scFv em sua forma solúvel (ROUIS *et al*, 2006), já que facilitam a purificação dos anticorpos devido a presença da sequência do peptídeo sinal *pelB*. Essa sequência, quando presente no vetor pHEN, permite a expressão, juntamente ao scFv, de um peptídeo sinalizador para o espaço periplasmático de bactérias *E. coli*, evitando a formação de corpos de inclusão por essas proteínas (HOOGENBOOM *et al*, 1991). No entanto, sabe-se também que é característico desses vetores a ausência de um forte promotor de expressão, o que justificaria a baixa produção de proteínas observada no clone pHEN-his-scFv, quando comparado ao clone pET28-a-scFv.

Apesar da alta expressão proporcionada pelo clone pET28-a-scFv, a dificuldade de obtenção e quantificação da proteína scFvLimAb7 purificada pode estar relacionada à pouca solubilização dos corpos de inclusão, à formação de agregados proteicos ou a demais falhas durante o uso do sistema manual de purificação por imunoafinidade (HENGGEN *et al*, 1995).

O uso de caudas, ou *tags*, é uma das principais ferramentas utilizadas para a marcação e identificação de proteínas recombinantes (ZHAO *et al*, 2010), e por ser uma sequência incomum ao genoma bacteriano, a reatividade positiva observada no ensaio de *Western blot* é um forte indicativo da construção correta da proteína scFvLimAb7 e da eficiência das técnicas empregadas.

Por fim, os resultados apresentados nos ensaios de ELISA e *Western Blot* evidenciam o reconhecimento de proteínas do veneno de *L. intermedia* pela proteína scFvLimAb7. Esses resultados sugerem a manutenção da funcionalidade e especificidade do paratopo do anticorpo monoclonal LimAb7 capaz de reconhecer as frações dermonecróticas do veneno de *Loxosceles intermedia* (MOURA *et al*, 2011 e ALVARENGA *et al*, 2003). Em relação à diferença no reconhecimento do veneno pelos anticorpos LimAb7 e scFvmAb7, Lim *et al* (2011) afirmam que a habilidade de anticorpos recombinantes desempenharem o mesmo efeito biológico que uma molécula inteira ainda pode depender da flexibilidade e afinidade dos sítios de ligação antígeno-anticorpo, e que a produção de variantes recombinantes deve ser investigada para a obtenção de melhores resultados.

Trabalhos como o de Yu *et al* (2012) afirmam que é possível melhorar a afinidade de anticorpos recombinantes a seus antígenos ao combinar desenhos computacionais à técnica de *phage display*. Nessa linha de pesquisa, modelos computacionais de complexos antígeno-anticorpo (ag-ac) e de estruturas de CDR permitem o desenho de mutações pontuais e o aprimoramento de paratopos. Lewis e Lloyd (2012) também estudaram o aumento da afinidade de ligação de anticorpos ao propor modelos de *ribosome display*, no qual complexos de mRNAs, ribossomos e de proteínas recém traduzidas são selecionados por afinidade ao antígeno de interesse. Outros trabalhos (KAWA *et al*, 2011) citam o uso de mutação sítio dirigida em regiões

específicas de CDR ou defendem a alteração de resíduos funcionais da ligação ag-ac por *scanning* de alanina.

Desse modo, são perspectivas para esse estudo: o melhoramento da afinidade de ligação da proteína recombinante scFvLimAb7 às proteínas dermonecróticas de *Loxosceles intermedia*; a melhor caracterização funcional da proteína scFvLimAb7 e; a avaliação de sua capacidade de inibir efeitos dermonecróticos *in vivo*.

6. CONCLUSÕES

Com os resultados apresentados neste trabalho, é possível concluir que a utilização de iniciadores degenerados para a amplificação das cadeias variáveis leve e pesada, a realização da *assembly* PCR para a junção dessas sequências, e o uso do vetor de expressão pET28-a mostraram-se técnicas eficientes para a obtenção dos domínios variáveis do anticorpo murino LimAb7. Juntamente com os resultados de sequenciamento de DNA obtidos, acredita-se que a metodologia aqui utilizada seja uma eficiente opção para a produção e caracterização de anticorpos recombinantes a partir de hibridomas secretores de anticorpos monoclonais. A comparação da sequência polipeptídica da proteína scFvLimAb7 com demais sequências disponíveis nos bancos de dados GenBank e IMGT, assim como o reconhecimento proporcionado pelo anticorpo anti-histidina à proteína recombinante em ensaios de *Western Blot*, também são dados que indicam a construção eficiente desse anticorpo.

Também é possível inferir que o paratopo responsável pelo reconhecimento das proteínas dermonecróticas de *L. intermedia* no anticorpo LimAb7 foi parcialmente mantido durante a produção da proteína recombinante. Desse modo, o anticorpo scFvLimAb7 pode ser considerado uma ferramenta promissora em ensaios de neutralização de enzimas esfingomielinases D por inibição do seu sítio ativo.

Até então, a técnica de produção de anticorpos de cadeia única contra toxinas aracnídicas era direcionada à neutralização de toxinas escorpiônicas, sendo o trabalho ora apresentado o primeiro a ter como relato o desenvolvimento de um anticorpo recombinante contra toxinas de aranhas. Ainda, acredita-se que o reconhecimento apresentado entre a proteína recombinante scFvLimAb7 e as toxinas do veneno de *Loxosceles intermedia* nos ensaios de ELISA e *Western Blot* seja um marco importante para estudos de neutralização de toxinas aracnídicas.

REFERÊNCIAS

- AHMAD, A. Z.; YEAP, S. K.; ALI, A. M.; HO, W. Y.; ALITHEEN, N. B. M.; HAMID, M. scFv Antibody: Principles and Clinical Application. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2012, p. 1-15, 2012.
- ALMEIDA D M, FERNANDES-PEDROSA M D, ANDRADE R. M., MARCELINO J. R., GONDO-HIGASHI H., DE AZEVEDO L., HO P. L., VAN DEN BERG C., TAMBOURGI D. V. A new anti-loxoscelic serum produced against recombinant sphingomyelinase D: results of preclinical trials. **American Journal of Tropical Medicine.**, v. 79, p. 463-470, 2008.
- ALVARENGA, L.; MARTINS, M.; MOURA, J.; KALAPOTHAKIS, E.; OLIVEIRA, J.; MANGILI, O.; GRANIER, C.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C. Production of monoclonal antibodies capable of neutralizing dermonecrotic activity of *Loxosceles intermedia* spider venom and their use in a specific immunometric assay. **Toxicon**, v. 42, p. 725-731, 2003.
- AMARO I, RIAÑO-UMBARILA L, BECERRIL B, POSSANI LD. Isolation and characterization of a human antibody fragment specific for Ts1 toxin from *Tityus serrulatus* scorpion. **Immunology Letters**, v. 139, p. 73-79, 2011.
- APPEL M, DA SILVEIRA R, CHAIM O, PALUDO K, SILVA D, CHAVES D, DA SILVA P, MANGILI O, SENFF-RIBEIRO A, GREMSKI W, NADER H, VEIGA S. Identification, cloning and functional characterization of a novel dermonecrotic toxin (phospholipase D) from brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom. **Biochimica et biophysica acta**, v. 3 p. 167-178, 2008.
- ARYA P, PONMARIAPPAN S, SINGH L, PRASAD GB. Antibodies Against Recombinant Catalytic Domain of Lethal Toxin of *Clostridium sordellii* Neutralize Lethal Toxin Toxicity in HeLa Cells. **Protein Peptide Letters.**, v. 20, p. 205-112, 2013.
- AUBREY N, MUZARD J, CHRISTOPHE PETER J, ROCHAT H, GOYFFON M, DEVAUX C, BILLIALD P. Engineering of a recombinant Fab from a neutralizing IgG directed against scorpion neurotoxin Aahl, and functional evaluation versus other antibody fragments. **Toxicon**, v. 43(3), p. 233-241.
- BARBARO KC, KNYSACK I, MARTINS R, HOGAN C, WINKEL K. Enzymatic characterization, antigenic cross-reactivity and neutralization of dermonecrotic activity of five *Loxosceles* spider venoms of medical importance in the Americas. **Toxicon**, v. 45(4), p. 489-499, 2005.

BRAZ, A.; MINOZZO, J.; ABREUB, J.; GUBERT, I.; OLORTEGUI, C. C. Development and evaluation of the neutralizing capacity of horse antivenom against the Brazilian spider *Loxosceles intermedia*. **Toxicon** v. 37, p. 1323-1328, 1999.

CATALÁN A, CORTES W, SAGUA H, GONZÁLEZ J, ARAYA JE. Two new phospholipase D isoforms of *Loxosceles laeta*: cloning, heterologous expression, functional characterization, and potential biotechnological application. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v. 25(6), p. 393-403, 2011.

CHAIM OM, SADE YB, DA SILVEIRA RB, TOMA L, KALAPOTHAKIS E, CHÁVEZ-OLÓRTEGUI C, MANGILI OC, GREMSKI W, VON DIETRICH CP, NADER HB, SANCHES VEIGA S. Brown spider dermonecrotic toxin directly induces nephrotoxicity. **Toxicological and Applied Pharmacology**, v. 211(1), p.64-77, 2006.

CHAIM O, TREVISAN-SILVA D, CHAVES-MOREIRA D, WILLE A, FERRER V, MATSUBARA FH, MANGILI O, DA SILVEIRA RB, GREMSKI L, GREMSKI W, SENFF-RIBEIRO A, VEIGA S. Brown Spider (*Loxosceles* genus) Venom Toxins: Tools for Biological Purposes. **Toxins**, v. 3, p. 309-344, 2011.

CHARDÈS T, VILLARD S, FERRIÈRES G, PIECHACZYK M, CERUTTI M, DEVAUCHELLE G, PAU B. Efficient amplification and direct sequencing of mouse variable regions from any immunoglobulin gene family. **FEBS Letters**, v. 452 p. 386-394, 1999.

CHENET, D.C.; WOLFART, S.C.; FERRUZZI, P.; QUADROS, R.M.; MARQUES, S.M.T. Incidence of spiders of public health importance in Curitiba, Santa Catarina. **Revista Ciência & Saúde**, v. 2, n.1, p.25-29, 2009.

CHOW S, CASADEVALL A. Monoclonal antibodies and toxins-a perspective on function and isotype. **Toxins**, v. 6, p. 430-454, 2012.

DEVAUX C, MOREAU E, GOYFFON M, ROCHAT H, BILLIALD P. Construction and functional evaluation of a single-chain antibody fragment that neutralizes toxin AahI from the venom of the scorpion *Androctonus australis hector*. **European Journal of Biochemistry**, v. 26 p. 694-702, 2001.

DOLEZAL, O.; PEARCE, L. A.; LAWRENCE, L. J.; MCCOY, A. J.; HUDSON, P.J.; KORTT, A. A. ScFv multimers of the anti-neuraminidase antibody NC10: hortening of the linker in single-chain Fv fragment assembled in V(L) to V(H)

orientation drives the formation of dimers, trimers, tetramers and higher molecular mass multimers. **Protein Engineering**, v. 13(8), p. 565-574, 2000.

DOUTHWAITE, J. A.; JACKSON, R. H. Ribosome Display and Related Technologies. **Methods in Molecular Biology**, v. 805, p. 139-161, 2012.

ESPINO-SOLIS G, RIAÑO-UMBARILA L, BECERRIL B, POSSANI L. Antidotes against venomous animals: state of the art and perspectives. **Journal of Proteomics**, v. 72, p. 183-199, 2009.

FELICORI L, FERNANDES P, GIUSTA M, DUARTE C, KALAPOTHAKIS E, NGUYEN C, MOLINA F, GRANIER C, CHÁVEZ-OLÓRTEGUI C. An in vivo protective response against toxic effects of the dermonecrotic protein from *Loxosceles intermedia* spider venom elicited by synthetic epitopes. **Vaccine**, p. 4201-4208, 2009.

GIUDICELLI, V.; LEFRANC, M. P. Ontology for immunogenetics: the IMGT-ONTOLOGY. **Bioinformatics**. v. 12, p. 1047-1054, 1999.

GOMES MT, GUIMARÃES G, FRÉZARD F, KALAPOTHAKIS E, MINOZZO JC, CHAIM OM, VEIGA SS, OLIVEIRA SC, CHÁVEZ-OLÓRTEGUI C. Determination of sphingomyelinase-D activity of *Loxosceles* venoms in sphingomyelin/cholesterol liposomes containing horseradish peroxidase. **Toxicon**, v. 57(4), p.574-579, 2011.

GREMSKI L, DA SILVEIRA R, CHAIM O, PROBST C, FERRER V, NOWATZKI J, WEINSCHUTZ H, MADEIRA H, GREMSKI W, NADER H, SENFF-RIBEIRO A, VEIGA S. A novel expression profile of the *Loxosceles intermedia* spider venomous gland revealed by transcriptome analysis. **Molecular Biosystems**, v. 12 p. 2403-2416, 2010.

HENGGEN, P. Purification of His-Tag fusion proteins from *Escherichia coli*. **Trend in Biochemical Science**, v. 20(7), p. 285-286, 1995.

HOGAN C, BARBARO K, WINKEL K. Loxoscelism: old obstacles, new directions. **Annals of Emergency Medicine**, p. 608-624, 2004.

HOOGENBOOM H, GRIFFITHS A, JOHNSON K, CHISWELL, D, HUDSON, P, WINTER G. Multi-subunit proteins on the surface of filamentous phage: methodologies for displaying antibody (Fab) heavy and light chains. **Nucleic Acids Research**, v. 19, p. 4133-4137, 1991.

ISBISTER GK, FAN HW. Spider bite. **Lancet**, v. 378, p. 2039-2047, 2011.

JUSTE M, MARTIN-EAUCCLAIRE MF, DEVAUX C, BILLIALD P, AUBREY N. Using a recombinant bispecific antibody to block Na⁺-channel toxins protects against experimental scorpion envenoming. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 64(2), p. 206-218, 2006.

KALAPOTHAKIS, E.; ARAUJO, S.C.; CASTRO, C.S.; GOMEZ, M.V.; MANGILI, O.C.; GUBERT, I.C; DINIZ, C.R.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C. Molecular cloning, expression and immunological properties of LiD1, a protein from the dermonecrotic family of *Loxosceles intermedia* spider venom. **Toxicon**, v.40, p.1691-1699, 2002.

KALAPOTHAKIS E, ARAUJO S, DE CASTRO C, MENDES T, GOMEZ M, MANGILI O, GUBERT I, CHÁVEZ-OLÓRTEGUI C. Molecular cloning, expression and immunological properties of LiD1, a protein from the dermonecrotic family of *Loxosceles intermedia* spider venom. **Toxicon**, v. 40, p. 1691–1699, 2012.

KAWA, S.; ONDA, M.; HO, M.; KREITMAN, RJ.; BERA, T. K.; PASTAN, I. The improvement of an anti-CD22 immunotoxin: conversion to single-chain and disulfide stabilized form and affinity maturation by alanine scan. **mAbs**, v. 3(5), p. 479-486, 2011

KAZUMA, S. expressão de fragmentos variáveis de cadeia simples anti-LDL eletronegativa (scfv) em *Pichia pastoris* e seu efeito sobre a formação de células espumosas. **Dissertação de Mestrado** - Universidade de São Paulo. São Paulo, 2010.

KNAPPIK A; BRUNDIERS, R. Recombinant Antibody Expression and Purification. **The Protein Protocols Handbook**, ed. 3, p. 1929-1943, 2009.

KOOHAPITAGTAM, M.; RUNGPRAGAYPHAN, S.; HONGPRAYOON, R.; KOSITRATANA, W.; SIRINARUMITR, T. Efficient amplification of light and heavy chain variable regions and construction of a non-immune phage scFv library. **Molecular Biology Reports**, v. 37(4), p. 1677-1683, 2010.

LEWIS, L.; LLOYD, C. Optimisation of antibody affinity by ribosome display using error-prone or site-directed mutagenesis. **Methods in Molecular Biology**, v. 805, p. 139-1361, 2012.

LIM D, LEE J, MUELLER M, CHOO A, WONG V. Cytotoxic antibody fragments for eliminating undifferentiated human embryonic stem cells. **Journal of Biotechnology**, v.153, p. 77-85, 2011.

LOVRECEK D, TOMIĆ S. A century of antivenom. **Collegium antropologicum**, v. 35(1), p. 249-258, 2011.

MARQUES-DA-SILVA, E.; FISCHER, M.L. Distribuição das espécies do gênero *Loxosceles* Heineken & Lowe, 1835 (Araneae; Sicariidae) no Estado do Paraná. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina tropical**, v.38(4), p.331-335, 2005.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Fundação Nacional de Saúde. Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos. 2 ed. Brasília. 2001.

MOREIRA, D C. Estudo da atividade hemolítica do veneno de *Loxosceles intermedia* (aranha marrom) e seus mecanismos moleculares. **Dissertação de mestrado** - Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2008.

MORGENSTERN D, KING GF. The venom optimization hypothesis revisited. **Toxicon**, v. 63, p. 120-128, 2013

MOURA J, FELICORI L, MOREAU V, GUIMARÃES G, DIAS-LOPES C, MOLINA L, ALVARENGA LM, FERNANDES P, FRÉZARD F, RIBEIRO R, FLEURY C, NGUYEN C, MOLINA F, GRANIER C, CHÁVEZ-OLÓRTEGUI C. Protection against the toxic effects of *Loxosceles intermedia* spider venom elicited by mimotope peptides. **Vaccine**, v. 29, p. 7992-8001, 2011.

MOUSLI M, DEVAUX X, ROCHAT H, GOYON M, BILLIALD P. A recombinant single-chain antibody fragment that neutralizes toxin II from the venom of the scorpion *Androctonus australis hector*. **FEBS Letters**, v. 442, p. 183-188, 1999.

MURAMATSU H, YOSHIKAWA K, HAYASHI T, TAKASU S, KAWADA Y, UCHIDA K, SATO S, TAKAHASHI T, SAGA S, UEDA R. Production and characterization of an active single-chain variable fragment antibody recognizing CD25. **Cancer Letters**, v. 225, p. 225-236, 2005.

OFRAN Y, SCHLESSINGER A, ROST B. Automated identification of complementarity determining regions (CDRs) reveals peculiar characteristics of CDRs and B cell epitopes. **Journal of Immunology**, v. 181, p. 6230-6235,

2008.

OKAMOTO T, MUKAI Y, YOSHIOKA Y, SHIBATA H, KAWAMURA M, YAMAMOTO Y, NAKAGAWA S, KAMADA H, HAYAKAWA T, MAYUMI T, TSUTSUMI. Optimal construction of non-immune scFv phage display libraries from mouse bone marrow and spleen established to select specific scFvs efficiently binding to antigen. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 323, p. 583–591, 2004.

OLAFSEN T, WU A. Antibody vectors for imaging. **Seminars in Nuclear Medicine**, v. 40, p. 167-181, 2010.

OLIVEIRA C, OLIVEIRA A, CHAIM O, LUGARINI D, PEREIRA B, PALUDOK S, TELLES J, VEIGA S, ACCO A. Effects of the venom and the dermonecrotic toxin LiRecDT1 of *Loxosceles intermedia* in the rat liver. **Toxicon**, v. 52, p. 695-704, 2009.

PAIXÃO-CAVALCANTI D, VAN DEN BERB C, GONÇALVES DE ANDRADE R, FERNANDES-PEDROSA M, OKAMOTO C, TAMBOURGI D. Tetracycline Protects against Dermonecrosis Induced by *Loxosceles* Spider Venom. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 127, p. 1410-1418, 2007.

PAULI, I.; MINOZZO, J.C.; DA SILVA, P.H.; CHAIM, O.M.; VEIGA, S.S. Analysis of therapeutic benefits of antivenin at different time intervals after experimental envenomation in rabbits by venom of the Brown spider (*Loxosceles intermedia*). **Toxicon**, v.53, p.660-671, 2009.

PAULI I, PUKAC J, GUBERT I, MINOZZO J. The efficacy of antivenom in loxoscelism treatment. **Toxicon**, v. 48, p.123-37, 2006.

RAAG R, WHITHLOW M. In vivo performance of Single-Chain Fvs. **FASEB Journal**, v. 9, p. 73-80, 1995.

RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ ER, LEDEZMA-CANDANOZA LM, CONTRERAS-FERRAT LG, OLAMENDI-PORTUGAL T, POSSANI LD, BECERRIL B, RIAÑO-UMBARILA L. A single mutation in framework 2 of the heavy variable domain improves the properties of a diabody and a related single-chain antibody. **Journal of Molecular Biology**, v. 423(3), p. 337-350, 2012.

ROUIS S, LAFAYE P, JAOUA-AYDI L, SGHAIER Z, AYADI H, GARGOURI-BOUZID R. Cloning and expression of functional single-chain Fv antibodies

directed against NIa and coat proteins of potato virus Y. **Journal of Virology Methods**, v. 137, p. 1-6, 2006.

RUIZ, M.; LEFRANC, M. IMGT gene identification and Colliers de Perles of human immunoglobulins with known 3D structures. **Immunogenetics**, v. 53, p. 857–883, 2002.

SAMS H, DUNNICK C, SMITH M, KING L. Necrotic arachnidism. *Journal of the American Academy of Dermatology*, v. 44, p. 561-576, 2011.

SANT'ANNA, O.A.; FARIA, M. Origens da imunologia: os anti-soros e a caracterização da especificidade na resposta imune. **Revista de Medicina**, v. 84, 2005.

SCHAEFER, J. V.; HONEGGER, A.; PLUCKTHUN, A. Construction of scFv Fragments from Hybridoma or Spleen Cells by PCR Assembly. **Antibody engineering**, v. 1, p. 21-44, 2010.

SISTEMA NACIONAL DE NOTIFICAÇÃO DE AGRAVOS - SINAN, Ministério Da Saúde, BRASIL. Disponibilizado em <<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/>>, 2012.

STOCK RP, BREWER J, WAGNER K, RAMOS-CERRILLO B, DUELUND L, JERNSHOJ KD, OLSEN LF, BAGATOLLI LA. Sphingomyelinase D activity in model membranes: structural effects of in situ generation of ceramide-1-phosphate. **PLoS One**, v. 7, p. 360-363, 2012.

SUN W, XIE J, LIN H, MI S, LI Z, HUA F, HU Z. A combined strategy improves the solubility of aggregation-prone single-chain variable fragment antibodies. **Protein Expression and Purification**, v. 83, p. 21-29, 2012.

TAMBOURGI D, PEDROSA M, ANDRADE R, BILLINGTON S, GRIFFITHS M, BERG D. Sphingomyelinases D induce direct association of C1q to the erythrocyte membrane causing complement mediated autologous haemolysis. **Molecular Immunology**, v. 44, p. 576-582, 2006.

THEAKSTON R, WARRELL D, GRIFFITHS E. Report of WHO workshop on the standardization and control of antivenoms. **Toxicon**, v. 41, p. 541-557, 2003.

TOLEIKIS, L.; FRENZEL, A. Cloning Single-Chain Antibody Fragments (ScFv) from Hybridoma Cells. **Methods in Molecular Biology**, v. 907, p. 59-71, 2012.

VAN DEN BERG C, GONÇALVES-DE-ANDRADE R, OKAMOTO C, TAMBOURGI D. C5a receptor is cleaved by metalloproteases induced by sphingomyelinase D from *Loxosceles* spider venom. **Immunobiology**, v. 217, p. 935-941, 2012..

VEIGA S, SILVEIRA R, DREYFUS, J, HAOACH J, PEREIRA A, MANGILI O, GREMSKI W. Identification of high molecular weight serine-proteases in *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. **Toxicon**, v. 38, p. 825-839, 2000..

VETTER R.S. Spiders of the genus *Loxosceles* (Araneae, Sicariidae): a review of biological, medical and psychological aspects regarding envenomations. **Journal of Arachnology**, v.1, p. 150-63, 2008.

VETTER R, SWANSON D. Loxoscelism. **Clinics in Dermatology**, v. 24, p. 213-221, 2006.

WARREL, D. A. Venomous bites, stings, and poisoning. **Infectious disease clinics of north america**, v. 26(2), p. 207-223, 2012.

WU Q, ZHANG J, LUO C, ZHANG T, WANG T, WANG M. Expression and Characterization of Recombinant Interleukin-21 Receptor and Its Targeting Single-Chain Variable Fragment Antibodies Selected from a Human Phage Display Library. **DNA and Cell Biology**, v. 31, 2012.

YUASA N, OGAWA H, KOIZUMI T, TSUKAMOTO K, MATSUMOTO-TAKASAKI A, ASANUMA H, NAKADA H, FUJITA-YAMAGUCHI Y. Construction and expression of anti-Tn-antigen-specific single-chain antibody genes from hybridoma producing MLS128 monoclonal antibody. **Journal of Biochemistry**, v. 151, p. 371-81, 2012.

YU, C. M.; PENG H. P., CHEN, I. C., LEE, Y. C., CHEN, J. B., TSAI, K. C., CHEN, C. T., CHANG, J. Y., YANG, E. W., HSU, P. C., JIAN, J. W., HSU, H. J., CHANG, H. J., HSU, W. L., HUANG, K. F., MA, A. C., YANG, A. S. Rationalization and Design of the Complementarity Determining Region Sequences in an Antibody-Antigen Recognition Interface. **PLoS One**, v. 7(3), p. 1-15, 2012.

ZAHID M, LOYAU S, BOUABDELLI M, AUBREY N, JANDROT-PERRUS M, BILLIALD P. Design and reshaping of an scFv directed against human platelet glycoprotein VI with diagnostic potential. **Analytical Biochemistry**, v.417(2), p. 272-282, 2011.

ZHAO, C.; HELLMAN, L. M.; ZHAN, X.; BOWMAN, W.S.; WHITEHEART, S.W.; FRIED, M.G.; Hexahistidine-tag-specific optical probes for analyses of proteins and their interactions. **Analytical Biochemistry**, v. 399 (2), p. 237-245, 2010.